UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

Année 1947 N° 114

CONTRIBUTION
A
L'ÉTUDE PHARMACOLOGIQUE DU BUIS

ETUDE
de son action inhibitrice sur la Cholinestérase du Sérum

THÈSE
Pour le Doctorat de l'Université
(MENTION PHARMACIE)

Présentée et soutenue publiquement en juin 1947

PAR

Robert LAURENT
Pharmacien
Diplômé de Sérologie et d'Hydrologie

MEMBRES DU JURY { MM. VINCENT, *Président.* ; BRUSTIER, CAUJOLLE, Mme DULUCQ-MATHOU, *Assesseurs.* ; M. BLANC, *Suppléant.* }

TOULOUSE
IMPRIMERIE F. BOISSEAU
34, Rue du Taur, 34
1947

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548928_0048

Contribution
à
l'Etude pharmacologique du Buis

UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie

TABLEAU DU PERSONNEL

Doyen ..... MM. CALVET
Assesseur ..... LEFEBVRE

Doyens honoraires .... MM. BARDIER, GORSE

Professeurs honoraires ..... MM. DALOUS, ESCAT, RISPAL, LAFFORGUE, ARGAUD, MOOG, MÉRIEL (E.), CAUBET, MAURIN, RIBAUT, SERR.

PROFESSEURS

Clinique de neurologie et psychiâtrie	MM RISER	Clinique médicale infantile et puériculture	MM. SOREL (R.)
Chinique médicale	TAPIE (J.), ROQUES	Pharmacie	CAUJOLLE
Clinique obstétricale	GARIPUY	Pathologie interne	MOREL
Physiologie	SOULA	Bactériologie, hygiène médecine sociale	ANDRIEU
Clinique chirurgicale et du Cancer	DUCUING	Clinique chirurgicale infantile et orthopédie	BOULARAN
Physique biologique et médicale	BUGNARD	Clinique de Maladies des Voies Urinaires	FABRE (P.)
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques ...	NANTA	Matière médicale	VINCENT
Chimie et Toxicologie ...	BRUSTIER	Hydrologie thérapeutique et Climatologie	MÉRIEL (P.)
Pathologie générale et médecine expérimentale ..	SENDRAIL	Anatomie Pathologique ..	FABRE (J.)
Clinique chirurgicale et gynécologique	LEFEBVRE	Clinique d'Oto-rhino-Laryngologie et de chirurgie maxillo-faciale.....	CALVET
Anatomie	VALLOIS, CLERMONT	Clinique ophtalmologique	CALMETTES
Histoire naturelle	DELAS	Chimie biologique	MONNIER
		Médecine légale et Déontologie	PLANQUES

Histologie et Embryologie M. BROUSSY

PROFESSEURS SANS CHAIRE

Physiologie..... M. BAISSET | Obstétrique..... M. GUILHEM
ANATOMIE..... M. COULOUMA

AGRÉGÉS

	MM.		MM.
Médecine	GADRAT, DARNAUD, GERAUD, DARDENNE, LAPORTE	Anatomie	LAZORTHES
		Histologie	BIMES, C. de f.
		Ophtalmologie	DEODATI
		Chimie médicale.....	VALDIGUIE (P.)
		Physique médicale	MARQUES
Chirurgie	VIRENQUE, GRIMOUD, RIEUNAU, DIEULAFÉ, DAMBRIN (Paul)	Pharmacie	COUTURIER
		Chimie générale pharmaceutique.....	BLANC
		Histoire naturelle pharmaceutique.....	Mme DULUCQ-MATHOU

COURS COMPLÉMENTAIRES

Cours d'obstétrique aux élèves sages-femmes ...MM	GARIPUY	Clinique de la tuberculose	MOREL, DAMBRIN (P.)
Cours d'anat. physiol. et pathol. aux élèves sages-femmes	GUILHEM	Parasitologie	LASSERRE
		Bot. et Cryptogamie	Mme DULUCQ-MATHOU
Chimie pathologique	VALDIGUIE(P)	Chimie analytique	BLANC
Chimie biologique	VALDIGUIE(P)	Hydrologie et Géologie ...	ASTRE
Chimie minérale	BLANC	Médecine sociale et du travail	BOUNHOURE
Stomatologie	CADENAT	Anatomie médico-chirurg .	THOMAS
Physique pharmaceutique	AUVERGNAT	Pharmacodynamie	BONHOURE
Dermatologie et syphiligraphie	BAZEX	Bactériologie et Hygiène..	LAPORTE
		Urologie	LHEZ
Législation pharmaceutique	BOUISSET	Ophtalmologie	DEODATI
Microbiologie	BOUISSET	Neuro Chirurgie	LAZORTHES
		Oto-rhino-laryngologie ...	N...

Secrétaire de la Faculté... M DUCROS

La Faculté mixte de Médecine et de Pharmacie déclare n'être pas responsable des opinions émises par les candidats. (Délibération en date du 12 mai 1891).

UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

Annee 1947 — N° 114

CONTRIBUTION
A
L'ÉTUDE PHARMACOLOGIQUE DU BUIS

ETUDE
de son action inhibitrice sur la Cholinestérase du Sérum

THÈSE
Pour le Doctorat de l'Université
(MENTION PHARMACIE)

Présentée et soutenue publiquement en juin 1947

PAR

Robert LAURENT

Pharmacien

Diplômé de Sérologie et d'Hydrologie

MEMBRES DU JURY { MM. VINCENT, *Président.* ; BRUSTIER, CAUJOLLE, *Assesseurs.* ; Mme DULUCQ-MATHOU, ; M. BLANC, *Suppléant.*

TOULOUSE

IMPRIMERIE F. BOISSEAU

34, Rue du Taur, 34

1947

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

A LA MEMOIRE DE MA MERE

A MON PERE

A TOUS LES MIENS

A MON MAITRE ET PRESIDENT DE THESE

MONSIEUR LE PROFESSEUR VINCENT

Qui nous a guidé dans cette étude et ne nous a jamais ménagé sa bienveillance et sa sollicitude. Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre respectueuse reconnaissance pour les conseils qu'il nous a prodigués, pour le très grand honneur qu'il nous fait en présidant cette thèse.

A MON JURY DE THESE

MONSIEUR LE PROFESSEUR BRUSTIER

MONSIEUR LE PROFESSEUR CAUJOLLE

MADAME DULUCQ-MATHOU

MONSIEUR LE DOCTEUR BLANC

Hommage de respectueuse gratitude.

A MES MAITRES

A MES AMIS

« *Celui qui met au jour ses pensées pour faire briller ses talents doit s'attendre à la sévérité de ses critiques ; mais celui qui n'écrit que pour satisfaire à un devoir a droit à l'indulgence de ses juges* ».

LA BRUYÈRE.

AVANT-PROPOS

Le Buis, plante banale, est connue depuis l'Antiquité où son feuillage, toujours vert et luisant, servait comme de nos jours d'ornement aux jardins.

La dureté de son bois est appréciée depuis les temps celtiques, et à cause de cette qualité était-il sans doute utilisé dans la confection de quelque arme primitive ou support d'armes, d'objets utiles et grossiers, avant d'en arriver à servir de matière première pour de gracieux objets sculptés dans sa masse.

Le Buis est aussi très anciennement connu comme plante toxique et médicinale, propriétés dues, au moins en partie, à la présence d'alcaloïdes.

Puisqu'il est reconnu purgatif, émétique et fébrifuge, il est intéressant d'approfondir son action toxique, de savoir pourquoi comme l'écrit de Freitas[38], reprenant les observations de deux physiologistes anglais Sydney Ringer et William Mürrel [115] :

« Le Buis est un poison paralysant qui agit sur les centres nerveux et plus spécialement sur la moelle épinière et le bulbe, son action principale ne porte pas sur les nerfs ni les muscles.

« Le Buis possède une action locale très énergique qui abolit en peu de temps les propriétés des muscles et des nerfs avec lesquels il se trouve en contact immédiat ».

Aussi, sur la suggestion de Monsieur le Professeur D. Vincent, et sous sa direction, avons-nous entrepris dans le Laboratoire de Matière Médicale une série de recherches d'ordre biochimique et pharmacologique en vue de tenter

d'élucider le mécanisme d'action du Buis, notamment en ce qui concerne son action inhibitrice sur la cholinestérase du sérum, mise en évidence par D. Vincent et Mlle Mathou [137].

Voici le plan que nous avons suivi dans cette étude :

Avant-Propos.

Première Partie. — Revue générale.

Chapitre I. — *Les Buxacées.*

Généralités sur les Buxacées.
Genre Buxus :
Description — Anatomie.
Localisation des Alcaloïdes.
Pharmacologie.
Usages.

Chapitre II. — *La Cholinestérase.*

Définition et Notions générales
Dosage, ses techniques.
Les inhibiteurs.
Les activateurs.
Son rôle physiologue.
Les modifications physiologiques et pathologiques de la cholinestérase et ses rapports avec la clinique médicale.

Deuxième Partie. — Recherches personnelles.

Chapitre I. — *Action du Buis et de ses diverses préparations sur la cholinestérase du Sérum* in vitro.

Chapitre II. — *Action du Buis* in vivo.

a) Expériences sur le cobaye.
b) Action sur le chien : étude pharmacologique sommaire.

Chapitre III. — *Une application pratique.*

Méthode de détection du Buis dans la bière.

Conclusions.

PREMIÈRE PARTIE

Revue Générale

« Je ne fay point de doute qu'il ne m'advienne souvent de parler de choses qui sont mieux traitées chez les Maîtres du métier, et plus véritablement ».

MONTAIGNE « Essais-Des livres).

CHAPITRE PREMIER

LES BUXACÉES

Généralités sur les buxacées.

Jusqu'aux dernières années du XVIII^e siècle, l'histoire des Buxacées se réduit à celle du Buis commun, que l'on ne distingue pas du Buis des Baléares.

Dès l'Antiquité, nous le trouvons cité dans le *Vieux Testament*, le *Talmud* et l'*Iliade*, il en est de même dans les écrits d'Aristote, de Théophraste, de Pline et de Strabon.

Au Moyen-Age, Sainte-Hildegarde [60], Leonhartus Fuchsius [42] l'indiquent comme plante médicinale, mais il faut attendre jusqu'en 1719, que le promoteur du « genre », Tournefort (J. de Pitton), définisse le genre *Buxus*.

En 1753 Linné l'admet avec une seule espèce qu'il nomme *Buxus sempervirens* [75, 3].

Dès 1797 viennent s'y ajouter comme espèces nouvelles : le *Buxus balearica* de Wildenow et les *Tricera* de Swartz, aujourd'hui section américaine des *Buxus*. Pour être complet, ajoutons que les genres affines sont peu à peu reconnus : *Pachysandra* (Michaux, 1803), *Styloceras* (Adrien de Jussieu, 1824), *Sarcococca* (Lindley, 1826), *Simmondsia* (Nutal, 1844).

Quelle position doivent occuper les Buxacées dans le règne végétal ?

Adrien de Jussieu [63] range le genre *Buxus* comme type de tribu dans la famille des Euphorbiacées. La tribu des

Buxacées est ensuite admise par Endlicher, Bentham et Hooker [14] et enfin par Van Tieghem [128, 2].

Au milieu du XIXe siècle, cette tribu prend rang de famille des Buxacées avec Klotzsch, Dumortier, Kirschleger, Plée et Agardh mais ce ne sera que Baillon (1856-1859) [9, 1, 2] qui s'occupera des caractères et des rapports de cette nouvelle famille.

Cette querelle de classification n'est qu'à son début : Müller [96] et Pax [104] inscrivent les Buxacées au voisinage des Euphorbiacées, Baillon (1877) décèle des caractères communs avec les Célastracées et les range même comme tribu dans cette dernière famille. Dans sa *Flore de France*, Bonnier [17] maintient le genre *Buxus* parmi les Euphorbiacées, mais dans son *Traité de botanique* en association avec Leclerc du Sablon, il range la famille des Buxacées dans la même série que les Célastracées ; Beille [13], Hegi [54] et d'autres la placent parmi les Sapindales ; Hallier [49], Hutchinson [61] vont jusqu'à la ranger parmi les Hamamélidales, Van Tieghem la rattache aux Géraniales. Mlle Mathou [87, 2] réussit à montrer que « par la morphologie, surtout par l'existence d'un disque intrastaminal, par les caractères anatomiques et par la présence d'alcaloïdes, les Buxacées s'éloignent des Hamamélidales, par contre ces caractères ne permettent pas encore de trancher pour le rattachement soit aux Euphorbiacées soit aux Célastrales ».

Les Buxacées, qui se rencontrent dans les diverses régions subtropicales et tempérées chaudes du globe, se présentent actuellement comme un groupe de quatre-vingts espèces réparties très inégalement en un nombre de tribus et de genres, variables selon les auteurs.

A la suite des travaux de Mlle Mathou [87, 2], auxquels nous nous référons souvent, on peut considérer que cette famille se subdivise en trois tribus et six genres :

Buxées : genre *Buxus* (*Eubuxus*, *Austrobuxus* *Tricera*, *Probuxus*).
genre *Notobuxus*.

Pachysandrées : genre *Pachysandra*,
genre *Sarcococca*,
genre *Styloceras*.
Simmondsiées : genre *Simmondsia*.

Ce genre est remarquable par la discontinuité de son aire de répartition. Il se rencontre en Europe avec les deux seules espèces *Buxus sempervirens* L et *Buxus balearica* Wild. On le trouve en outre en Afrique (Algérie, Abyssinie, Socotora, Nyassaland, Madagascar), en Asie sur les bords de la Mer Noire, où il est abondant, au Japon, en Indochine et surtout en Chine (ce pays semble du reste être son centre de dispersion pour l'ancien monde) et en Océanie (Iles de la Sonde, Phillipines). Par ailleurs les Buis Américains (section *Tricera*) sont très nombreux dans l'Amérique Centrale. Les Antilles sont en effet le deuxième centre de dispersion du genre.

***

Genre Buxus

Description. — Linné [75, 3] n'a reconnu au genre *Buxus* qu'une seule espèce et en a fourni dans son « *Systema vegetabilium* » la diagnose suivante :

1053 BUXUS 1394
MASC : Cal. 3 phyllus
Petala 2
Germinis rudimentum
FOEM : Cal. 4 phyllus
Petala 3
Styli 3
Caps. 3-rostris, 3-locularis
Sém. 2

SEMPERVIRENS I Buxus

Aujourd'hui nous pouvons dire des *Buxus* [9, 2] [87, 2] Arbustes ou arbrisseaux toujours verts, quelquefois pres-

que des arbres, très rameux, à rameaux tétragones, par suite de la décurrence des pétioles. Feuilles persistantes décussées, sans stipules, pétiolées, à limbe entier et ovale, penninerves, très polymorphes.

Fleurs monoïques. Inflorescences axillaires et terminales en épis ou en grappe ou mixtes, parfois contractées en glomérules, parfois réduites à des triades. Ces inflorescences se composent typiquement, de la base au sommet, de bractées alternes ou opposées, comme les feuilles elles-mêmes à l'aisselle desquelles sont placées les fleurs. Les fleurs mâles sont latérales, nombreuses, décussées aussi, l'unique fleur femelle est terminale.

Fleur mâle : une bractée axillaire ; quatre sépales opposées en deux verticilles croisés ; quatre étamines indépendantes, opposées aux sépales, à filet épais et à anthère introrse, bi-loculaire, à pollen jaune, pulvérulent, et finement granuleux ; au centre un pistillode, rudiment de gynécée, terminé par quatre lobes glandulaires.

Fleur femelle : bractées en nombre variable, le plus fréquent six ou sept, sur deux verticilles ou en spirale du type 2/5. Ovaire à trois carpelles à trois loges biovulées, placentation pariétale, tout au début, devenant axile par suite du déplacement des placentas se rejoignant sur l'axe de l'ovaire. Ovules anatropes, à raphée externe et à micropyle supère interne, pourvus d'un obturateur. Styles au nombre de trois, libres, correspondant aux nervures dorsales des carpelles alternant, à leur abse, avec des nectaires supraseptaux.

Fruit : capsule surmontée de trois styles persistants, à dehiscence loculicide, déterminant la séparation de trois valves entières bicornes par fissuration des branches stylaires.

Graine : de une à deux par valves, lisse, luissante, à peu près triangulaire, à caroncule caduque et à arille partiellement persistante. Embryon légèrement arqué, entouré d'un albumen oléagineux et aleurique.

Anatomie. — La structure anatomique des *Buxus* est en principe normale.

En ce qui concerne la tige, on doit cependant noter la présence de méristèles corticales au nombre de quatre situées dans le parenchyme des quatre angles. Ces méristèles corticales sont orientées : liber externe, bois interne ; parallèlement à chacune d'elles court un cordon fibreux latéral externe qui s'y accole pour les prolonger ensuite.

Parfois ce cordon fibreux peut se dédoubler et dans certaines espèces on voit un cordon latéral externe et un autre interne.

Contrairement aux Buis d'Europe et d'Asie, la section américaine *Tricera* ne présente ni méristèles ni cordon fibreux.

Van Tieghem [128, 1] interprète cette disposition des méristèles comme résultant de la croissance intercalaire des nœuds, élongation nodale portant sur leur tranche inférieure.

En ce qui concerne la feuille, quelques particularités peuvent être retenues. Les Buis d'Europe et d'Asie présentent un pétiole parcouru par un faisceau libéro-ligneux sur les côtés duquel courent les cordons fibreux. Les Buis d'Amérique et d'Afrique présentent un pétiole à trois faisceaux conducteurs.

L'épiderme de la feuille est fortement cutinisé et uniquement stomatifère sur la face inférieure. Le limbe a généralement un parenchyme dissymétrique, parenchyme palissadique à la partie supérieure, parenchyme lacumeux à la partie inférieure. Le limbe des espèces européennes et asiatiques subit le phénomène du clivage : arrivées à un certain âge, les feuilles se divisent en deux lames, supérieure et inférieure, n'adhérant entre elles que sur les bords de la feuille. La partie supérieure comprend l'épiderme supérieur, le tissu palissadique, le réseau des nervures et la presque totalité du tissu lacuneux, la partie inférieure

comprend alors le reste du tissu lacuneux et l'épiderme inférieur.

Signalons la présence d'oxalate de calcium, sous forme de cristaux isolés ou de mâcles, dans le mésophylle et le parenchyme fondamental des feuilles ; leur présence, près de la nervure médiane dans l'assise sous-épidermique inférieure, détermine selon l'expression de Mlle Ch. Ternetz [127], une « poussière farineuse » visible *de visu* à la face inférieure des feuilles.

Le genre *Buxus* présente, en outre, un appareil secréteur bien différencié. Van Tieghem, le premier, signala « des cellules isolées un peu plus grandes que les autres et remplies d'un liquide hyalin », dans l'écorce de la tige et dans la feuille, surtout dans la couche palissadique, du *Buxus balearica* Wild. Solereder [124], confirma ces remarques à propos du *Buxus sempervirens* L.

En 1930, Martin Sans et Pouchet [84] [85] montrèrent l'existence d'un véritable système secréteur chez les Buis, et en 1940, Mlle Mathou [87, 2] vérifia la généralité de ce système, dans toutes les espèces des Buxacées.

L'appareil secréteur des Buxacées est constitué de deux sortes de cellules : les unes globuleuses, présentes surtout dans les feuilles, les autres allongées et de diamètre variable, tantôt sensiblement égal à celui des cellules voisines, tantôt beaucoup plus réduit. On le rencontre dans les divers organes.

Se basant sur ces données morphologiques et anatomiques la subdivision du genre *Buxus* a été établie comme suit :

4 étamines : Genre *Buxus*.

I. Inflorescences en épis ou grappes, contractées ou non en glomérules. Pétiole possédant un arc conducteur et 2 cordons fibreux latéraux. Tiges renfermant des méristèles corticales ..... *Eubuxus*

a) Fleurs mâles sessiles. Méristèles corticales accompagnées d'un seul cordon fibreux latéral externe.

Sous-section *Sessiliflorae* :Type *Buxus Sempervirens*

b) Fleurs mâles pedicellées. Méristèles corticales accompagnées de 2 cordons fibreux, l'un externe, l'autre interne.

Sous-section *Pedicellatae* : type *Buxus balearica.*

II. Inflorescences groupées par trois. Pétiole possédant à sa base trois faisceaux conducteurs « libres » qui se fusionnent ensuite : *Austrobuxus*

III. Fleurs en grappes. Pétiole ne présentant sur toute sa longueur que trois faisceaux conducteurs.

Ni méristèles, ni cordons fibreux dans l'écorce.

Section américaine ..... *Tricera*

IV. Inflorescences en triades. Pétiole à trois faisceaux comme *Tricera* (pétiole) tiges à méristèles ..... *Probuxus*

a) Fleurs mâles : étamines normales et pistillode ; fleurs femelles à périanthe type 3. Nectaires ovariens interstylaires. —

Sous-section ..... *Buxanthus*

b) Fleurs mâles : filets staminaux et pistillode très réduits ou nuls ; fleurs femelles périanthe type 2. Pas de nectaires ovariens.

Sous-section ..... *Buxella.*

(d'après Mlle Th. Mathou) [87, 2].

***

Localisation des alcaloïdes. —L'étude microchimique a révélé la présence d'alcaloïdes dans tous les genres et espèces de la famille des Buxacées. Ces principes se ren-

contrent dans le système secréteur, mis en lumière par Martin-Sans, et dans des cellules non différenciées du parenchyme. Par contre, l'étude chimique reste limitée à celle, déjà ancienne, du *Buxus sempervirens* L.

Fauré en 1830, partant d'une macération alcoolique (alcool à 40° chaud) de la poudre d'écorce de Buis, établit l'existence d'une substance alcaline, à laquelle il donne le nom de Buxine [33]. Il lui trouve les caractères suivants : poudre rousse, odeur nulle, saveur très amère, sans acreté, beaucoup plus soluble dans l'eau bouillante que dans l'eau froide, très soluble dans l'alcool, peu dans l'éther, les alcalins ne la dissolvent pas ; en sa présence le sirop de violette donne une couleur verte, le papier de tournesol rougi passe au bleu ; avec les acides elle donne des sels mais incristallisables, très solubles dans l'eau et dans l'alcool ; la potasse, la soude, l'ammoniaque, la précipitent d'une solution aqueuse sous forme d'une gelée.

La même année, Thomas (1) signale que la buxine de Fauré a pu être obtenue cristallisée par Couerbe : au sulfate de buxine, obtenu suivant le mode d'extraction de Fauré, on ajoute l'acide nitrique, ce dernier s'empare de la résine, on obtient un sulfate pur duquel on peut précipiter la buxine pure.

En Allemagne Walz [144] et Bley [16] puis Scholtz [119] établissent les bases d'une nouvelle extraction par macération sulfurique, Walz donne à la buxine la formule suivante [71] :

$$C_{19}\,H_{21}\,NO_3$$

En 1868 Pavia [103] obtient deux alcaloïdes qu'il nomme buxine et parabuxine, en partant d'une macération dans l'acide sulfurique dilué qu'il reprend ensuite par l'acide oxalique.

Alessandri [3], en 1882, dénombre trois alcaloïdes :

(1) Thomas, *Journ. de Pharm.*, 1830, 20-51.

buxéine, buxine et parabuxine, mais la buxéine et la buxine ont des propriétés identiques, l'auteur lui-même admet que « des études ultérieures prouveront qu'il s'agit d'un seul et même corps ».

Barbaglia [10], un an plus tard, détermine le mode d'extraction des alcaloïdes du *Buxus sempervirens* L, en perfectionnant la technique de Pavia. Il s'est basé sur les solubilités différentes des oxalates alcaloïdiques dans l'alcool et de ces oxalates et des alcaloïdes eux-mêmes dans l'éther. Ses recherches ont abouti à la découverte de trois nouveaux alcaloïdes : buxinidine, parabuxinidine et buxinamine s'ajoutant aux deux déjà connus et confirmés : buxine et parabuxine, et lui ont permis en outre de mettre en évidence certaines substances colorantes buxorubine, buxoviridine et buxocrocine.

Nous résumons en un tableau la solubilité comparée entre ces alcaloïdes et leurs oxalates :

	Buxine		Parabuxine		Buxinidine		Para-Buxinidine		Buxinamine	
	Alc.	Oxal	Alc.	Oxal	Alc.	Oxal	Alc.	Oxal	Alc.	Oxal
H_2O	Sol.		Peu		Insol.		Insol.			
Alcool	Très	Sol.	Sol.	Insol.	Insol.	Insol.	Très	Insol.	Très	Insol.
Ether	Très	Insol.	Très	Sol.	Insol.	Insol.	Sol.	Insol.	Très	
SO_4H_2 dilué			Très		Très					
ClH dilué			Très		Très					
$(COOH)_2$ dilué			Très							

L'identité admise par certains auteurs, tels Walz [144] et Fluckiger [37], entre la buxine de Fauré et d'autres alcaloïdes surtout la bébéérine, extraite de l'Ecorce du Bébéeru ou la pélosine de la racine des *Pareira brava* ne semble pas devoir être retenue [71].

***

Pharmacologie. —La propriété la plus importante du Buis est sa toxicité. Toutes les parties du *Buxus Sempervirens* L sont vénéneuses.

Les qualités qu'on lui a attribuées tout d'abord sont étonnantes ainsi qu'en témoigne ce qu'a écrit John Preiss [1] :

... « L'influence fâcheuse du Buis. sur ceux qui se livrent au sommeil auprès de cette plante, est réputée comme ayant la vertu de chasser le Diable. Le bois rapé et cuit dans l'eau pure doit être bon contre le cours de ventre, enfin ce serait un cosmétique qui jaunirait les cheveux »...

... « Quelles propriétés et qualités a le Buys ? », s'est inquiété de Meuve [2]. « Il est chaud et sec. Comme il ressemble en quelque façon au Gayac, il en a aussi les propriétés, car l'expérience fait voir qu'il est sudorifique, si bien qu'il y a quelques modernes qui l'appellent le Gayac de notre France, et qui assurent que la décoction guérit aussi heureusement et sûrement la vérolle que celle du Gayac »...

Bligny a assuré que l'infusion chaude des feuilles de Buis faite avec du vin soulageait la « colique venteuse ». Tandis que Bosinus Centitius dans les « Ephémérides d'Allemagne » a affirmé que la décoction de Buis faite dans la lessive se révélait un remède souverain contre la chute des cheveux, si l'on en « bassinait » la tête. Voici l'exemple cité : l'intéressée, une femme, avait vu ses cheveux tomber après une fièvre maligne ; ayant appliqué cette décoction sur sa tête et ayant eu la face mouillée dans le traitement, ses cheveux avaient bien repoussé, mais, en plus, les poils de la partie humectée de la face. Cette vertu, l'auteur l'appela « trichopoyctique » ou action faisant croître les cheveux.

Après avoir attribué à cette plante des vertus surnaturelles ou imaginaires, voici des considérations plus sérieuses :

(1) John Preiss, *Herbarium hortu sanitatis*, Strasbourg, 1507.
(2) De Meuve, *Dictionnaire pharmaceutique*, 1678.

Linne [75, 2] dans sa *Materia medica*, a écrit au sujet du genre *Buxus* :

Pharm : Buxi lignum ∴ Gt XX
Comp. : tetra foetida, amara
Vis. : Sudorifera, mundificans
Fol. : Purgans, pellens.
Usus : Hirsuties ∴ Epilepsia. Hysteria.

Plus tard, en se basant sur l'étude de faits physiologiques réels, le Buis et ses préparations galéniques ont été employés d'une manière plus rationnelle. Ses propriétés médicinales se sont précisées.

Chevalier et Richard (1827), Bouchardat (1846) ont signalé que le Buis par son bois (écorce et racine) est sudorifique, ce qui l'a fait employer dans le traitement des maladies syphilitiques secondaires et tertiaires et des rhumatismes chroniques, mais Bouchardat écrivait dans son *Manuel de matière médicale de thérapeutique comparée et de pharmacie* (1846), que, le plus souvent, on l'associait à d'autres sudorifiques.

En Allemagne, la teinture alcoolique du Buis avait la réputation d'être un excellent fébrifuge ; l'empereur Joseph II pour la somme de 1.500 florins avait acheté à l'empirique, qui en avait l'administration exclusive, le secret de la préparation et l'avait rendu public. Mais alors elle n'a plus guéri les fièvres intermittentes et elle est tombée dans l'oubli.

Plus tard, Neydeck [100] a montré que la poudre de feuille de Buis, à la dose de 2 gr. 50 par jour, avait une action réelle contre les fièvres intermittentes, en guérissant en 1856 une épidémie de fièvres régnant dans la contrée très marécageuse d'Umkirck. Et en 1859, au Congrès des Naturalistes et Médecins Allemands à Carlsruhe, il a présenté une courte monographie intitulée : « Le Buis, remède le plus efficace et le moins coûteux contre les fièvres intermittentes ».

Après son aïeul, Bazoche [11] a étudié, en cherchant à l'expliquer, l'action sudorifique du Buis et son action purgative incontestable. Il préconisait de ne pas employer le Buis dans les accès où le stade de sueur était trop prononcé.

Vers la même époque, Cazin [20], reprenant les idées déjà émises sur le Buis et ses préparations, a mis en évidence l'action de cette plante dans les affections rhumatismales articulaires. Il a réussi à guérir un arthritisme chronique, suite d'un rhumatisme articulaire aigu mal soigné. Pour cela il employait une décoction de 30 gr. de racine rapée bouillie dans 1 kg. d'eau réduit à moitié pour trois doses à prendre dans la même journée.

Puis il a étudié l'action du sulfate de buxine, préparé selon la méthode de Fauré modifiée par Thomas, avant de l'employer, comme fébrifuge. Il a fait des expériences sur le lapin et le chien qui voisinent les accidents toxiques. Il administrait d'abord 0 gr. 50 de sulfate de buxine à un lapin, cela ne lui donnait aucun résultat appréciable, la dose était triplée, l'animal paraissait étourdi, présentait des mouvements hésitants, semblait être fatigué. Les mêmes effets étaient constatés chez le chien. La dose était ensuite portée à 4 gr. : superpurgation, suivie de sommeil (attribué à la fatigue) mais pas de mort. A l'autopsie un état inflammatoire était constaté à l'estomac mais surtout à l'intestin grêle et au duodénum.

Cazin n'a pas hésité à l'expérimenter sur lui-même. Notons qu'il avait administré avec succès du sulfate de buxine à une jeune fille atteinte d'un accès de fièvre du type tierce.

En même temps, en Italie, Albani, Anelli, Bazzoni, Mazzolini, Senna, Tibaldi, Tiraboschi, Vitali, ont eux aussi, sans connaître les essais de Cazin, expérimenté la buxine de Pavia, employée à la dose de 1 gr. en potion. La proportion de guérison dans les cas de fièvres intermittentes était de l'ordre de 75% (83% de guérison pour la quinine).

Ces tentatives, si elles n'ont pas provoqué d'accidents sérieux, ont été accompagnées de troubles iûtestinaux, parfois de vomissements, de diarrhées, de vertiges, de bourdonnements d'oreilles, observés par Cazin, et montrent que ce médicament doit être maniè avec prudence et réserve.

Signalons enfin l'emploi de l'huile de Buis obtenue par distillation empyreumatique du bois.

Avant l'apparition de l'huile de Cade, elle était utilisée dans le traitement des affections de la peau contre les dartres et la gale. Cazin préconisait son administration à l'intérieur, étendue dans l'eau ou dans une solution mucilagineuse, contre la leucorrhée et la blennorrhée. Contre les maladies de dents provenant de la carie, elle était employée autrefois comme aujourd'hui la créosote.

Mais le Buis n'a pas que des propriétés curatives. Certains auteurs, tels Cornevin [24], Ringer et Murrel [115], de Freitas [38], ont étudié l'intoxication par le Buis.

Deux physiologistes anglais : Syndey Ringer et William Murrel ont étudié le *Buxus Sempervirens* L au point de vue physiologique pour édifier une nouvelle théorie de la vraie nature du tétanos. En expérimentant sur des grenouilles, auxquelles ils injectaient par voie hypodermique deux sortes d'extraits : l'un dilué contenant dans chaque goutte « le principe actif d'un grain de feuilles sèches de Buis », l'autre concentré trois fois plus fort, ils arrivaient aux conclusions suivantes :

« Le Buis détermine la perte du pouvoir locomoteur par ses effets sur les centres de volition ou sur les centres moteurs du cerveau ;

— il déprime la fonction réflexe de la moelle ;

— il donne du tétanos en même temps qu'il produit une paralysie progressive de la fonction réflexe coordonnée de la moelle ;

— par son influence sur la moelle il produit une paralysie complète ;

— il ne produit aucun effet sur les nerfs moteurs et sensitifs, ni sur les muscles ».

Un autre physiologiste, de Freitas, a repris les expériences et les conclusions de ces deux auteurs dans ses *Observations sur le Buis* pour refuter leur théorie du tétanos et au lieu de ne s'attacher, comme eux, qu'à l'action générale toxique du Buis, il a étudié, en plus, l'action locale.

Voici ce qu'il a conclu :

« Le Buis est un poison paralysant qui agit sur les centres nerveux et plus spécialement sur la moelle épinière et le bulbe, son action principale ne porte pas sur les nerfs ni les muscles.

« Le Buis possède une action locale très énergique, qui abolit, en peu de temps. les propriétés des muscles et des nerfs, avec lesquels il se trouve en contact immédiat ».

Il a signalé en outre que le net ralentissement du rythme cardiaque observé dans ses expériences, ne doit pas faire considérer le Buis comme un poison cardiaque « son action n'est due qu'à la diffusion lente de l'endroit piqué au cœur ».

Quant à Cornevin, il a étudié les cas d'empoisonnements chez les hommes et les animaux.

S'il y a eu chez les hommes des intoxications, cela est dû uniquement à l'emploi du Buis ou de ses préparations pour frauder (emploi du Buis en remplacement du houblon dans la fabrication de la bière) ou pour falsifier (feuilles de sené, écorce de grenadier).

Chez les animaux, surtout domestiques, les cas d'intoxication signalés sont dus à l'aridité du pays (accidents survenus à des chameaux ayant brouté des feuilles de Buis d'après J. Hanway [52]), ou une mauvaise composition de leur repas (Hübschen [81], vétérinaire Suisse, a signalé la mort d'un porc auquel on avait distribué feuilles et tiges de Buis, la mort avait fait son œuvre 24 heures après), ou la cause en est accidentelle (le Buis dans l'Ardèche est utilisé comme litière).

Chez l'homme les phénomènes toxiques peuvent être ainsi définis :

A petites doses : éméto-purgatif.

A doses moyennes : symptômes nerveux : courbatures, quelques secousses musculaires, vertiges, bourdonnements d'oreille, puis période de coma avec retour à l'état normal au réveil.

A fortes doses : mort comme après usage abusif des drastiques avec douleurs intestinales intenses, flux dyssentérique, épreintes, convulsions, gêne respiratoire, troubles circulatoires.

Autopsie : lésions inflammatoires étendues et violentes de l'appareil digestif, ainsi que de la congestion pulmonaire, indice de l'asphyxie à la dernière phase de l'empoisonnement.

On peut se demander s'il serait prudent de consommer la viande d'un animal empoisonné par le Buis. Selon Gubler, la buxine ne s'éliminerait pas par les urines, mais elle subirait une décomposition dans l'économie [47]. D'où il serait intéressant de savoir si la buxine n'entrerait pas dans des combinaisons organiques pour former des ptomaïnes ou des leucomaïnes vénéneuses.

L'action purgative du Buis est un fait incontestable, or à côté il se greffe des phénomènes secondaires qui gênent la possibilité d'emploi de cette plante. Quant à l'action fébrifuge, on a peine à la prendre en considération, le sulfate de buxine peut-il être un rival sérieux du sulfate de quinine dans le traitement des fièvres intermittentes ?

Artault de Vevey et Leclerc par leurs observations contemporaines ont tenté de remettre en honneur certaines propriétés du Buis surtout pendant la guerre 1914-1918 [130, 1] [72, 1].

« Le Buis donne des résultats remarquables dans les fièvres intermittentes d'angiocholite, qui sont absolument réfractaires à la quinine, le médicament exerce sur les voies

biliaires une action indéniable ». Leclerc a supposé qu'Artault de Vevey l'a interprété comme « une action laxative doublée d'une action cholagogue spécifique ».

Le Buis est un fébrifuge et un cholagogue. Artault de Vevey a prescrit le Buis sous forme de teinture ou d'alcoolature à la dose de 4 gr. par jour. A un malade qui, revenant de Salonique, présentait depuis 6 mois des troubles cholériques avec une fièvre intermittente rebelle à la quinine, il a ordonnè XXV gouttes d'alcoolature avant chacun des deux repas. Ce dernier a été guéri.

Le Buis n'est donc pas un spécifique des fièvres paludéennes car son action se fait surtout sentir dans les cas de fièvres intermittentes d'origine hépatique, il est plutôt un cholagogue qu'un succédané de la quinine.

L'histoire thérapeutique du Buis demanderait une étude plus poussée des observations émises par Artault de Vevey et Leclerc et gagnerait en valeur et en force si l'étude pharmacodynamique de chacun des alcaloïdes signalés avait été entreprise, il est même probable qu'elle apporterait de nouvelles indications intéressantes comme les expériences de Ringer et Murrel et les observations de de Freitas permettent de le préjuger.

Fraudes et usages. — Le Buis, à côté de sa vogue médicinale, possède un certain attrait industriel. C'est une plante courante, facile à se procurer à peu de frais, d'où son emploi pour frauder ou falsifier d'autres plantes ou parties de plantes [20, 81, 106, 108].

La substitution des cônes de houblon par les feuilles de buis pour maintenir l'amertume de la Bière fut communément utilisée pendant la guerre 1914-1918.

En outre, les falsifications des feuilles de séné et d'uva-ursi par celles de Buis peuvent être décelées, non seulement par l'examen morphologique, mais aussi par l'étude microscopique [55].

BUIS	SÉNÉ	UVA URSI
— Bois avec trachéides à ponctuation aréolée.	Bois sans trachéides.	Bois sans trachéides.
— Stomates entourés par quatre ou cinq cellules *polygonales* à la face inférieure uniquement.	Stomates bordées par deux, parfois trois cellules annexes réniformes, souvent inégales et dont deux sont *allongées* parallèlement à la direction de l'ostiole.	Stomates larges et gros bordés par cinq ou six cellules à la face inférieure seulement.
— Poils tecteurs unicellulaires coniques très courts et lisses.	Poils tecteurs unicellulaires coniques et rares, à parois assez épaisses recouvertes de petits tubercules.	Poils tecteurs unicellulaires coniques, et poils glanduleux pluricellulaires.
— Mésophylle hétérogène asymétrique.	Mésophylle hétérogène symétrique. Cellules à mucilage dans l'épiderme.	Mésophylle hétérogène asymétrique.
— Cristaux prismatiques et mâcles.	Mâcles, cristaux prismatiques dans endoderme seulement.	Cristaux prismatiques, pas de mâcles.

L'écorce de Buis falsifie celle de grenadier : machée l'écorce du *Buxus sempervirens* L ne croque pas sous la dent comme celle du *Punica granatum*, elle ne porte jamais de bois sur sa face interne, tandis qu'on en trouve très fréquemment sur celle du grenadier.

Au microscope, la poudre de l'écorce de Buis diffère : par la disposition irrégulière des mâcles qui ne sont pas rangées en séries parallèles et alternantes, par la présence de grosses fibres libériennes, en général isolées, qui, dans leur ensemble, sont disposées en files radiales, et surtout par la présence de trachéides à ponctuation aréolée.

Dans l'industrie, le bois du Buis est utilisé à cause de sa dureté. Suivant quelques étymologistes, le Buis que nos pères écrivaient « *Bouys* » signifierait bois de fer :

bou = bois et ys = fer, en celtique. « *In igni quoque duritia, quœ ferre* » (Pline, Bazoche, *loc. cit*).

Les instruments fabriqués étaient des objets de toilette (peigne, par exemple), des instruments de musique, des instruments ménagers (cuiller, fourchette, etc...) des instruments pour cordonniers, des instruments médicaux (spéculum, plessimètre, stéthoscope, etc...), des instruments d'art (tabatière, surtout les Jeux d'Echec, etc...). Son bois admet aussi la gravure. Il est le plus inaltérable et le plus pesant de nos bois indigènes, le seul qui précipite au fond de l'eau.

CHAPITRE II

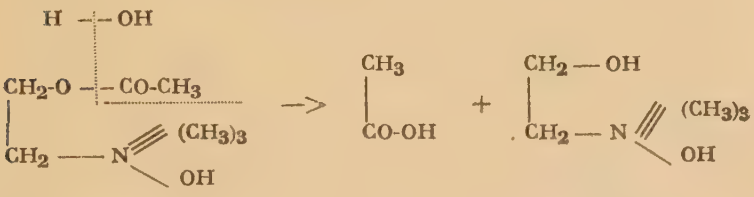
LA CHOLINESTERASE

Définition et notions générales.

La cholinestérase est un enzyme, classé parmi les Estérases et rattaché au grand groupe des Hydrolases.

Ce ferment fut pressenti par Dale [26] en 1914, découvert par Engelhart [31] Lœwi et Navratil [77].

Sa propriété essentielle est d'hydrolyser l'acétylcholine, ester acétique de la choline, en ses deux éléments : acide acétique et choline.



acétylcholine — choline

Depuis les travaux, aujourd'hui classiques, de Loewi [76] Dale et Felberg [27], il est reconnu que l'acétylcholine agissant comme « médiateur chimique » du système nerveux est libérée aux terminaisons nerveuses et au niveau des synapses centrales lors du passage de l'influx. Son existence reste éphémère du fait de l'intervention de la cholinestérase. Ainsi libérée, cette choline est pharmaco-

logiquement dix mille fois moins active que son ester acétique, donc est considérée comme quantité négligeable.

Kahane et Lévy [65, 1 a 6], Gautrelet et son école [44, 51] Kochtojanz [69], D. Vincent et A. Jullien [134], mirent en lumière l'étendue de la répartition de la cholinesterase dans le monde animal, aussi bien chez les vertébrés que chez les invertébrés. Nachmansohn [97, 1 a 6], Marnay [82], démontrèrent l'intensité élective de cette action enzymatique dans le système nerveux et neuro-musculaire, en particulier au niveau des synapses centrales et des plaques motrices, action qui a pour but d'hydrolyser et d'inactiver l'acétylcholine, dès la libération, afin d'empêcher sa diffusion hors des organes réacteurs. Aujourd'hui il est admis que la cholinestérase existe pratiquement dans tous les organes.

Après avoir acquis des notions solides sur sa localisation, les recherches s'orientèrent vers son extraction. Ainsi, Nachmansohn et Marnay [98, 6] découvrirent que l'organe électrique de « *Torpedo vulgaris* » était le plus riche de tous les organes examinés jusqu'ici par eux, en cette estérase. Après broyages de cet organe, précipitations et centrifugations, ils obtinrent un extrait dont :

1cc. hydrolysait en 1 h. 0 gr. 200 à 0 gr. 500 d'acétylcholihe à $\theta = 20°$.

On n'est pas encore bien renseigné sur la structure de cet enzyme. Nachmansohn et Lederer [99] concluent à la présence de groupements — (SH) actifs. Massart et Dufait [86] considèrent l'ion Ca + + comme un activateur physiologique du ferment. La cholinestérase apparaît donc comme un protéïde probablement calcique dont les groupes —(SH) assurent un rôle important à son activité.

Depuis quelques années, certaines recherches (Mendel et Mundell, Mendel et Rudney, Mendel, Mundell et Rudney [92] [93] [94]) nous ont fait connaître l'existence de deux types de cholinestérase « la vraie et la pseudo-cholinestérase dont la spécificité n'est pas la même vis-à-vis des diffé-

rents esters de la choline et dont les deux *optima* d'action ne coïncident pas suivant la concentration du substrat acétylcholinique. Déjà auparavant, Alles et Hawes [2] (1941), Richter et Croft [113] (1942), Zeller et Bissegger [150] (1943) avaient signalé des différences importantes de comportement biochimique entre la cholinestérase du sérum et celle des globules rouges ou du système nerveux, une constatation semblable à propos de l'effet inhibiteur de l'*Iboga* sur la cholinestérase des divers organes a été faite aussi par D. Vincent et Mlle Séro [142].

Dosage. — Ses techniques.

A l'heure actuelle, ne pouvant ni l'isoler à l'état pur, ni la connaître parfaitement au point de vue chimique, sa concentration n'est exprimée qu'en fonction de l'intensité et de la vitesse de la réaction qu'elle catalyse.

Les méthodes de dosage de cette activité cholinestérasique sont multiples, et reposent sur un principe commun et simple ; il suffit de déterminer en fonction du temps et sous certaines conditions physiques données l'intensité d'hydrolyse d'une solution d'acétylcholine de titre connu mise en présence d'un sérum ou d'un extrait d'organe broyé.

Cette activité fermentaire est mesurée, soit par des procédés biologiques, soit par des procédés chimiques.

Les techniques d'ordre biologique reposent sur les principes suivants :

— Dosage après action du ferment, pendant un temps donné et dans des conditions bien définies, de l'acétylcholine restante.

— Mesure de la vitesse de cessation des effets de l'acétylcholine sur diverses préparations après addition de l'estérase.

Dans le premier cas, le dosage de l'acétylcholine restante repose sur la méthode au muscle de sangsue ésériné (Führer [43] et Minz [95]), ou au muscle du rectus ésériné de grenouille (Chang et Gaddum [21]).

D. Vincent [131, 2], en 1938, utilisait une série d'extraits d'organes à des taux de dilution de plus en plus élevés, et les mettait en présence d'une quantité constante d'acétylcholine. Après un temps de contact fixe, il déterminait la dilution limite au delà de laquelle l'extrait d'organe peut être considéré comme impuissant à hydrolyser la totalité de l'acétylcholine du milieu. Le pouvoir cholinestérasique correspondait à ce seuil.

Dans le deuxième cas, mesure de la vitesse de cessation des effets de l'acétylcholine sur des organes, on a préconisé l'emploi du cœur d'*Hélix pomatia* arrêté par une solution d'acétylcholine : on note le temps que met l'extrait étudié pour hydrolyser l'acétylcholine ce que l'on reconnaît au fait que le cœur reprend son rythme (Halpern et Corteggiani) [51] ; on utilise aussi la méthode au muscle « *rectus abdominalis* » de grenouille contracté par une solution d'acétylcholine : la vitesse de décontraction du muscle est proportionnelle au titre cholinestérasique du sérum ou de l'extrait étudié (Gautrelet et Scheiner) [45].

Ces méthodes n'étant ni d'une grande sensibilité, ni d'une précision rigoureuse, sont relativement peu utilisées en pratique, on leur préfère les méthodes chimiques.

Les techniques d'ordre chimique reposent sur le dosage de l'acide acétique libéré par l'hydrolyse de l'acétylcholine.

De nombreux auteurs se sont attachés à la mise au point de ces méthodes, nous pouvons citer leur nom : Stedman et Easson [30], Renshaw et Bacon, Ammon et Voss [5], Stedman et White [126], Quastel [112], Valquist, Hall et Lucas [50], et en France l'adaptation clinique faite par D. Vincent, G. Segonzac et Mlle de Prat [140].

Personnellement nous avons utilisé cette dernière dont

nous exposerons la technique dans la deuxième partie de ce travail.

Selon les méthodes employées, pour le titrage de l'acide acétique libéré en fonction du temps, on divise ces dernières en deux groupes :

a) *Méthodes alcalimétriques*, qui sont simples et à portée de tout laboratoire et qui consistent à neutraliser l'acide acétique libéré par une solution de NaOH de titre connu en présence d'un indicateur coloré approprié : rouge de Crésol, bleu de bromothymol, dosage s'effectuant soit par titration continue à pH constant selon Willstätter [147], Stedmann et White [126], Hall et Lucas [50] soit par titration discontinue selon l'adaptation de D. Vincent, G. Segonzac et Melle de Prat [140].

b) *Méthodes manométriques*, dans lesquelles l'acide acétique libéré agit sur le liquide de Ringer bicarbonaté en déplaçant CO_2 du bicarbonate : le volume de CO_2 dégagé, titré manométriquement dans l'appareil de Warburg, est proportionnel à l'activité du ferment.

Cette technique, préconisée par Ammon (1935), permet de s'affranchir de beaucoup de difficultés ; elle permet de travailler avec précision et à pH constant, d'étudier des coupes de tissus et surtout des produits colorés, qui, par leur nature ou leur forme, interdisent l'emploi de l'alcalimétrie.

Son inconvénient est de nécessiter un appareil coûteux et de manipulation délicate que trop peu de laboratoires peuvent encore utiliser.

Signalons, pour être complet, la méthode électro titrimétrique de Glick [46], celle électrométrique de Scoz et Cattannéo [121] et la méthode colorimétrique de Abdon et Uvnas [1], etc...

Les inhibiteurs de la cholinestérase.

L'étude des inhibiteurs de la cholinestérase est inséparable de celle du ferment et de celle de l'acétylcholine elle-même.

L'activité enzymatique de la cholinestérase est liée à divers facteurs physiques.

La cholinestérase, maintenue à la glacière, conserve son activité plusieurs mois mais cette stabilité se détruit en quelques jours si cette estérase est gardée à température ordinaire.

L'action de la température, le pH du milieu, sont très importants ; cette activité, paralysée par le froid, croît avec la température jusqu'à un *optimum* variant entre 37° -40°, un chauffage prolongé à 56° bloquant irréversiblement son action. Il semble d'après les travaux de Bernheim [15] et Glick [46] que le pH *optimum* se situe aux environs de 8,4, son influence serait essentielle (Plattner, Galehr et Kodera (1928) [109] et Kahane [64]) On constate que l'acidité inhibe cette activité, la cholinestérase n'agit plus que faiblement à pH = 6,2 et plus du tout à pH < 4, 4 la fixité de cette action se situerait entre 6, 8 ⩽ pH ⩽ 7,6.

Pour un pH > 8, cette activité augmente puisque la vitesse d'hydrolyse spontanée de l'acétylcholine est déjà considérable en milieu alcalin et que le ferment catalyse cette réaction.

L'irradiation ultraviolette détruit irréversiblement cette activité fermentaire, c'est grâce en partie à cette propriété que Loewi et Navratil (1926) [77] démontrèrent l'existence de la cholinestérase ; l'exposition prolongée à la lumière solaire détermine une action semblable due à celle de la portion ultra-violette de son spectre.

La dilution dans un solvant organique usuel tel que : l'alcool, l'acétone, entraîne une nette inhibition de ce ferment.

A côté des conditions physiques défavorables, susceptibles de bloquer cette action enzymatique, la présence de corps chimiques de natures variables, peut provoquer également, sinon une inhibition totale de l'estérase, tout au moins un ralentissement notable de l'hydrolyse.

Nombreuses sont donc les substances chimiques qui se sont révélées inhibitrices de la cholinestérase.

Ammon [4, 2] dans une revue générale parue en 1943, nous apporte une vue d'ensemble fort détaillée sur les inhibiteurs de la cholinestérase. Nous nous efforcerons d'en fournir un résumé.

Un groupe particulièrement important de ces inhibiteurs est formé par les Uréthanes.

Parmi les Uréthanes naturels citons l'ésérine et son génalcaloïde. Loewi et Navratil (1926) [77], les premiers mirent en lumière l'action inhibitrice de l'ésérine, alcaloïde du *Physostigma venenosum*, cette substance présente en même temps la propriété de sensibiliser le muscle et les divers organes à l'action de l'acétylcholine. Cet effet sensibilisant est dû, en partie à son action inhibitrice sur la cholinestérase, en partie à son action directe sur les organes (Kahane et Lévy) [65. 3]. Mlle Maugein (1943) [89] et P. Beaujard (1944) [12], nous ont fourni une étude fort détaillée de ce comportement. La génésérine est sensiblement 5 fois moins inhibitrice que son alcaloïde [132, 1].

Par suite d'analogie de structure chimique, des uréthanes de synthèse tels que la prostigmine, la miotine (Matthes [88], Easson et Stedman [30]), le méta-compound de Stedman (Bacq et Brown [8], Schweitzer et Wright [120]), se sont révélés comme des inhibiteurs très actifs.

A côté de la choline et de son ester acétique de la famille chimique des bases ammoniums, il existe des composés, soit esters de la choline non lysables, soit d'autres ammoniums quaternaires, susceptibles d'affinités pour la cholinestérase et pouvant ainsi gêner ou ralentir la décomposition de l'acétyl-choline par le ferment. Citons parmi les

substances inhibitrices de ce groupe : la carbaminoylcholine ou « Doryl », des colorants comme le bleu de méthylène, le bleu Nil, la safranine (Reichert et Schmidt) [114] ou ceux du groupe de la phénothiazine (H. Collier et D. Allen) [23]. En outre,signalons la bufoténine (Sobotka et Antopol) [123] et la muscarine (Ammon) (Keeser) [68]).

A la suite de ces deux groupes, mentionnons le groupe des Amines et Amides ; des alcaloïdes surtout, des sulfamides, des antihistaminiques de synthèse en forment l'ossature.

A part l'ésérine et son génalcaloïde déjà étudiés et signalés par Loewi et Navratil, lesquels décelèrent en même temps l'action inhibitrice de l'ergotamine et l'ergobasine, les alcaloïdes ont fait l'objet de nombreuses études à ce point de vue.

Les alcaloïdes de l'Opium : la morphine (Kahane et Levy) [65, 3], Bernheim [15], Gautrelet et Scheiner [45] et l'apomorphine (Bernheim) [15], puis la codéïne, la dionine, la papavérine, la narcotine, étudiés en comparaison avec l'émétine de l'*ipécacuanha* (Kahn et Surles) [66], se montrèrent d'une activité bien différente les uns des autres. P. Beaujard [12], chercha même à en dresser une liste à activité décroissante, il attribue à la papavérine le pouvoir le plus fort et à l'héroïne le plus faible. Parmi les dérivés de la codéïne deux corps méritent d'être signalés : le dicodid et l'eucodal, ces produits, sensibilisateurs puissants du muscle de sangsue à l'acétylcholine, sont doués d'un effet très énergique sur la cholinestérase du muscle de sangsue, mais, par contre, n'agissent que très modestement sur le ferment du sérum de cheval (Dastugue, Bresson et Ghandour) [29], Kahane et Lévy).

Parmi les sédatifs, citons la cocaïne (Ammon [4, 1], Keeser [68]) dont l'action inhibitrice se révèle relativement élevée, et les produits anesthésiques locaux de synthèse, surtout la novocaïne, dont l'association avec l'acétylcholine a été utilisée (Ratschov, Payr [105], Ammon). La novocaïne possède dans sa formule une fonction alcool

estérifiée par l'acide para-amino-benzoïque. Cet acide aurait un pouvoir assez marqué sur la cholinestérase (Zeller). Voisins du groupe de la cocaïne sont d'autres corps alcaloïdiques à structure tropanique : l'atropine (Ammon, P. Beaujard), l'hyoscyamine et la scopolamine inhibent peu intensément la cholinestérase.

Citons parmi les inhibiteurs alcaloïdiques : la quinine et la nicotine (Matthes) [88] la strychnine (Nachmansohn) [97, 8] le curare (Harris) [53], l'ibogaïne (D. Vincent et I. Sero) [142], la pelletierine, la cicutine, la colchicine, la quinine (à pouvoir se rapprochant de celui de l'ésérine), la cinchonine, la cinchonidine, la thébaïne, la vératrine (à pouvoir plus modeste) (D. Vincent et P. Beaujard) [132, 1], les alcaloïdes du *Buxus sempervirens* L. (D. Vincent et Melle Mathou) [137] qui manifesteraient un intense effet inhibiteur sur lequel nous reviendrons longuement plus loin.

Zeller [150] en étudiant l'activité de l'acide para-amino-benzoïque porta ses recherches vers les sulfamides entre autres : prontosil album, sulfathiazol ; l'inhibition serait élevée pour le sérum humain et irait en décroissant pour les sérums de cheval, de bœuf et de cobaye. Récemment Paget et Dellhemmes (1947) [101] ont étudié de nouveau cette inhibition qui est marquée surtout pour le sulfamidothiazol et la sulfamidopyridine sur le sérum de cheval.

Parmi les substances actives sur le système cardio-vasculaire, l'hexétone, corps se rapprochant du camphre chimiquement et pharmacologiquement, possède un pouvoir antifermentaire très net.

Citons aussi les travaux de Wense [145] sur l'urée et l'histamine dont l'activité anticholinestérasique est insignifiante. D. Vincent et P. Brygoo [133, 2] étudiant quatre anti-histaminiques de synthèse : 929 F — 1571 F — 2339 RP (antergan) et 2786 R.P. (néo-antergan), nous revèlent qu'ils sont des inhibiteurs actifs de la cholinestérase sérique.

La présence d'un groupement —(SH) actif étant admise dans la structure chimique de ce ferment d'après les travaux de Nachmansohn et Lederer [99], ceci explique que la cholinestérase voit son activité diminuée en présence des principaux réactifs du thiol : le cuivre, l'acide monoiodacétique, l'acide maléique, l'alloxane, même le gluthation oxydé, inactivent plus ou moins l'enzyme.

Les acides cholique, glycocholique et désoxycholique (Sobotka et Antopol) manifestent une nette activité antifermentaire ; dans les lésions hépatiques où il y a élévation de la cholémie et augmentation du taux des sels biliaires, on observe souvent un abaissement du pouvoir cholinestérasique du sérum mais le mécanisme d'inhibition par les éléments de la bile n'est qu'une cause accessoire car ses lésions retentissent plus directement sur l'élaboration même du ferment dans le foie.

D. Vincent et Mlle de Prat [139] après Sobotka et Antopol et Ammon surtout, nous révèlent l'inhibition fermentaire par des toxines microbiennes diphtériques et tétaniques, l'inhibition est très faible, elle n'est pas suffisante pour justifier leur toxicité.

Les essences végétales, particulièrement les essences des Aurantiées et surtout des Labiées (Bergamotte, Menthe, Lavande, Thym, Sauge et Romarin) selon les travaux de F. Caujolle, D. Vincent et Franck [19] montrent un pouvoir inhibiteur important.

Parmi les hormones inhibitrices citons : la vagotonine (Santenoise) [116], l'adrénaline, la thyroxine (Schaller [117], Herschberg [57]).

Les vitamines C (Riechert et Schmidt [114], Herschberg [57]), K, E, (Herschberg) sont légèrement inhibitrices.

Herschberg, à la suite de travaux importants, nous signale l'activité antifermentaire de quelques anions : F, Br, I, et des cations suivants : Ag, Pb, Li, As, Sb, Cu, Mg, Fe, Zn. Signalons aussi les sels d'Or (Frommel, Herschberg et Piquet [40]) et enfin l'action extraordinaire du

di-isopropyl-fluorophosphate (Mazur et Bodansky) [90] qui bloque totalement et irréversiblement la cholinestérase.

Tout dernièrement, D. Vincent et P. Brygoo [133, 1], ont observé l'action anticholinestérasique des médicaments arsenicaux antisyphilitiques.

In vitro : pour les dérivés minéraux, ils ont vérifié le pouvoir inhibiteur de l'arsenite et la non activité de l'arseniate ; pour les dérivés organiques ils ont montré l'inactivité des trivalents : novarsenobenzol, sulfarsenobenzol, et l'action plus nette des pentavalents : stovarsol, arsaminol, tryparsamide, et celle plus importante de l'acétylarsan, voisine du pouvoir de l'atoxyl.

In vivo : les résultats ont été légèrement différents : les arsenicaux manifestent une tendance à augmenter leur pouvoir antifermentaire, les trivalents, inactifs *in vitro*, acquièrent une légère mais sensible activité lors de l'injection soit chez l'animal soit même chez l'homme lors des injections arsenicales thérapeutiques.

Les activateurs.

De nombreux auteurs, tels Mendel [92, 93, 94], Massart et Dufait [86] Nachmansohn [97, 1], constatèrent qu'une préparation de cholinestérase dialysée retrouvait par simple addition d'ions métalliques bivalents son activité perdue par dialyse.

Nachmansohn propose la classification suivante par ordre décroissant : Ba + +, Ca + +, Mg + +, Mn + +, les ions K + et Na + ne seraient pas dépourvus d'activité, s'ils sont utilisés à hautes doses. Massart et Dufait n'attribuent aucune activité aux ions Ba + + et Cd + + ; Sn + + aurait une action discrète, seuls seraient actifs Ca + +, Mg + + et Mn + +.

L'ion Ca + + paraît être un activateur physiologique de la cholinestérase. D. Vincent et Malbec [136] ont vu expé-

rimentalement que l'injection intraveineuse de gluconate de Ca provoque une certaine élévation de l'activité de la cholinestérase du sérum, alors que ce médicament n'a pas d'action directe *in vitro*.

Citons aussi l'acide ascorbique dont on a montré le rôle dans les estérases en général, les hyposulfites selon Frommel, Herschberg et Piquet [40], ainsi que l'histidine (Herschberg) [57].

Son rôle physiologique

En 1921 Loewi [76] apporte aux théories émises par Eliott, reprises par Dixon qui pressentaient l'existence de médiateurs chimiques, une confirmation éclatante : la présence d'une substance vagale ou « hormone vagale ». Deux cœurs de grenouille sont perfusés par le liquide de Ringer. L'excitation du nerf vague de l'un entraîne au bout d'un certain temps, nécessaire à la diffusion de la substance vagale dans le liquide de perfusion, le ralentissement de l'autre.

« L'hormone vagale » de Loewi a été identifiée à l'acétylcholine (Feldberg et Minz) [34], on crut même qu'elle était spécifique du système para-sympathique (Engelhart [31], Dale et Feldberg [27]).

Mais cette notion de médiation cholinergique se retrouve dans les ganglions sympathiques (Chang et Gaddum [21], Feldberg et Vertiainen) au niveau des fibres pré-ganglionnaires du système sympathique, au niveau des synapses centrales et plaques motrices (Dale et Feldberg).

La transmission de l'influx nerveux au niveau des synapses ne peut se produire que grâce au médiateur chimique.

A l'heure actuelle nous connaissons trois variétés de médiateurs chimiques : l'acétylcholine, l'adrénaline et l'histamine, à chacun correspond un faisceau de fibres nerveuses, cholinergiques, adrénergiques ou histaminer-

giques, formant des systèmes physiologiques bien différents, mais pouvant réagir les uns sur les autres par un processus de « médiation seconde ». La libération d'acétylcholine entraîne celle de l'adrénaline dans la surrénale, ainsi que l'ont démontré les expériences de Houssay et Molinelli Feldberg et Minz, Hermann [56] et ses élèves.

Après avoir considéré l'acétylcholine dans ses rapports immédiats avec le passage de l'influx nerveux et si, par la suite, des controverses se sont élevées quant à son origine, sa répartition et son existence sous diverses formes dans l'organisme (Kahane et Levy [65], Gautrelet et Cortegianni [44]), la difficulté majeure consiste dans sa disparition.

La découverte d'une estérase, présente dans les tissus et le sang, susceptible d'hydrolyser le médiateur chimique, permit tout à la fois de comprendre la fugacité de l'action de l'hormone vagale, de prolonger cette action par l'emploi d'inhibiteurs de la diastase et d'identifier celle-ci séparément de l'acétylcholine.

Ainsi le rôle fondamental de la cholinestérase est d'empêcher, d'une part, la diffusion de l'acétylcholine libérée au niveau des synapses nerveuses, et d'autre part, de ne permettre l'action de ce médiateur chimique que pendant un temps très court, celui de l'influx nerveux.

Le médiateur chimique et son hydrolase demeurent liés tant dans le domaine physiologique et expérimental, que dans le domaine pathologique, où les perturbations de l'activité fermentaire, soit des humeurs, soit des tissus sont à même de provoquer des répercussions : inséparables encore en thérapeutique et en pharmacodynamie où l'action fugace de l'acétylcholine est due à l'activité de la cholinestérase.

A la suite de recherches citées plus haut on a établi des différences biochimiques fondamentales existant entre la cholinestérase du sérum et celle du système nerveux ; il est constaté que la cholinestérase sérique dite pseudo-

cholinestérase est nettement indépendante de la cholinestérase du système nerveux dite vraie ou spécifique. Elle est sans doute aussi différente dans sa signification physiologique.

L'étude de la répartition de la cholinestérase du système nerveux montre que l'on est actuellement assez bien renseigné sur son rôle.

Nachmansohn [97], dans d'importants travaux concernant la répartition de la cholinestérase dans le système nerveux central a montré que l'enzyme est électivement localisé dans la substance grise et les noyaux gris centraux qui sont riches en synapses.

Les résultats obtenus par Nachmansohn montrent que la disproportion de l'activité cholinestérasique entre la substance blanche et la substance grise est en faveur de son rôle dans la médiation acétylcholinique.

Mais quel est le rôle de la cholinestérase du sérum ? A-t-elle un rôle dans la médiation cholinergique ? Cela n'apparaît pas absolument certain.

On a montré que certaines espèces, telles les Bovidés, ne possèdent pas de cholinestérase dans leur sérum (Stedman et White) (1933), Ammon et Voss (1935), Gunther (1946) [48]. Dans de nombreux cas pathologiques : dans l'insuffisance hépatique ou la tuberculose cachectisante, un véritable effondrement de l'activité de la cholinestérase du sérum se rencontre sans qu'on observe de signes de dérèglement nerveux important.

En pathologie aucun parallélisme n'est constaté entre le niveau d'activité cholinestérasique du sérum et le tonus neuromusculaire ou neuro-végétatif (D. Vincent, Aron et Herschberg [7]).

L'activité de la cholinestérase du sérum peut être réduite à peu près à zéro par injection de di-isopodyl-fluorophosphate, inhibiteur très puissant, sans que la mort s'en suive ou même sans que des symptômes apparaissent (Mazur et Bodansky) [90].

Cependant, on peut attribuer à la cholinestérase du sérum un rôle antitoxique de protection : « protection contre la possibilité de décharges exagérées d'acétylcholine, qui ne semblent pourtant pas être du domaine de la physiologie normale, protection aussi dans le cas de la thérapeutique humaine contre l'irruption massive d'acétylcholine-médicament injecté dans l'organisme » D. Vincent [131, 6].

Liebbrecht (1947) a indiqué un rôle de réserve de la cholinestérase sérique [74]. Cette dernière pouvant aller se fixer dans les centres pour suppléer à la carence locale d'enzyme.

Cette hypothèse ne repose sur aucune base expérimentale. D'ailleurs l'enzyme du système nerveux et l'enzyme du sérum sont de caractères biochimiques nettement différents et il est improbable qu'ils soient interchangeables.

Enfin signalons que Zeller [150] suggère la possibilité d'un rôle métabolique de la cholinestérase analogue à celui de la lipase mais qui serait lié dans le sang et les organes au métabolisme des dérivés choliniques. Ce rôle reste encore fort obscur.

Les modifications physiologiques et pathologiques de la cholinestérase et ses rapports avec la clinique médicale.

« A la suite de résultats physiologiques remarquables obtenus dans le problème de la médiation cholinergique où la cholinestérase a un rôle si important, il était logique d'attendre un corollaire clinique, riche d'applications pathogéniques et physio-pathologiques. Mais ici les espoirs ont été en grande partie déçus, et si l'application clinique de l'étude de la cholinestérase du sérum a donné jusqu'à présent des résultats intéressants, ce n'est justement pas là où on les attendait, c'est-à-dire dans l'étude des maladies nerveuses et neuro-musculaires » (D. Vincent) [131, 5].

Après les premières tentatives faites en 1936 par Hicks et Mc Kay [59] sur les myopathies, myasthénies, où ils constatèrent une élévation anormale de la cholinestérase, Stedman et Russel [125] Pichler [107], ultérieurement, décelèrent plutôt un abaissement de l'activité de l'enzyme, tandis que Jones et Stadie [62] et plus récemment, Wilson et Stoner (1944) [148] la trouvèrent normale.

Passouant [102] dans sa thèse sur la maladie de Steinert, observe un abaissement de cette activité chez deux myotoniques ; de plus, sur une biopsie de muscle myotonique, il nota cette observation : quantité considérable d'acétylcholine bien supérieure au taux normal et diminution nette de l'activité cholinestérasique.

Au sujet de la maladie de Parkinson, Yokoti [149] décela un abaissement cholinestérasique, expliquant par là la rigidité musculaire ; Pichler ne trouva aucune modification notable et Kaswin [67], récemment, constata au contraire, une augmentation de cette activité cholinestérasique.

Froment et Kaswin [39] étudiant les polynévrites notèrent une différence dans le comportement de la cholinestérase du sérum selon les formes chimiques : augmentation de son activité dans les polynévrites éthyliques et arsenicales, taux normal ou abaissement dans les polynévrites diphtériques et diabétiques ainsi que dans la poliomyélite.

A l'occasion de l'observation d'un cas de tétanie avec hypocalcémie intense (0 gr. 040 pour 1000) accompagnant une activité cholinestérasique fort abaissée, D. Vincent, G. Segonzac, Mlle de Prat et P. Brygoo [141], ont émis l'hypothèse que « la perturbation de l'équilibre calcique (Ca + + étant, d'après Massart et Dufait un activateur physiologique de la cholinestérase) entraînerait la diminution d'activité de la cholinestérase, et de ce fait, les crises tétaniques pourraient être reliées à la persistance anormale du médiateur aux plaques motrices ». Bien différente cependant est une deuxième observation (*in* thèse Mlle de Prat) [111] qui se rapporte à une tétanie latente, à

calcémie normale, où la crise typique facilement provoquée par l'hyperpnée, ne s'accompagnait d'aucune modification notable de la cholinestérase du sérum, qui, un peu élevée en dehors des crises, s'abaissait très modérément tout en se maintenant dans les limites normales lors de la crise provoquée.

Chez l'animal, Turpin et Lefevre observèrent une baisse légère de la cholinestérase sanguine dans une crise tétanique expérimentalement provoquée par hyperpnée.

L'abaissement de l'activité fermentaire, se retrouve aussi dans la tuberculose (Scoz et Cattannéo [121], Mlle de Prat, Vincent et Malbec [136], dans certaines maladies infectieuses (Mlle de Prat) et dans les pneumonies (Mogens-Faber) [32] dans les cas d'anémies, anémies pernicieuses et anémies causées par des hémorragies du tractus gastro-intestinal (Mogens-Faber), dans le cancer à une phase avancée , où l'anémie et l'hémorragie ont agi simultanément (Antopol, Verebely, Mogens, Faber), dans les décompensations cardiaques avec anasarque, dans les insuffisances rénales (Mc George [79], Mogens Faber).

C'est surtout en dehors des maladies nerveuses que l'étude de la cholinestérase sanguine se révèle la plus féconde dans ses applications cliniques, citons surtout le cas des maladies hépatiques où l'abaissement est considérable (Antopol, Tuchman et Shifrin (1937) [6], Mc. George (1937) [79], Mc Arde (1940) [78], Mogens Faber (1943) [32].

En 1942, D. Vincent et Mlle de Prat [139], attirent l'attention des cliniciens par leurs observations dans l'insuffisance hépatique grave, notamment : cirrhose, en décompensation et ictères graves. Ces recherches furent confirmées et étendues un peu plus tard par D. Vincent, G. Segonzac et Mlle de Prat [140]. Depuis Fiessinger, Glomaud et Carlotti étendirent encore ces données, insistant sur la valeur pronostique de l'abaissement de la cholinestérase lors de l'évolution des cirrhoses [35, 36].

A l'inverse, on peut observer aussi des cas où il existe

une augmentation d'activité de la cholinestérase sérique ; c'est le cas des hypertendus, des diabétiques et des thyroïdiens (Faber, Mlle de Prat ; Cristol, Passouant, Benezech et Mlle Dutartre [25]).

Récemment encore, Liebrecht (1947) a étudié l'élévation de la cholinestérase dans l'hypertension [74].

D'autre part, D. Vincent et P. Brygoo signalent que la syphilis peut se ranger, surtout dans les premières périodes, parmi les maladies manifestant une augmentation de l'activité cholinestérasique du sérum [133, 1].

A signaler aussi l'abaissement de la cholinestérase sérique dans les phénomènes de choc : choc traumatique et choc anaphylactique d'après les travaux de Danielopolu [28] et de Frommel et Piquet [41], ainsi que par Laborit et Morand [70] dans le mal de mer. On peut se demander dans quelle mesure la cholinestérase du sérum est en relation avec l'état d'hypervagotonie ou d'hypersympathicotonie.

Les résultats ne concordent pas régulièrement et il semble illusoire de vouloir tirer de l'étude de la cholinestérase du sérum des renseignements sur le comportement du système de médiation cholinergique neuro-musculaire. Si la cholinestérase du système nerveux joue un rôle capital dans ce processus, celle du sérum dite « pseudo-cholinestérase » en est notablement différente. Son étude s'est d'ailleurs révélée intéressante dans d'autres maladies que celles du système nerveux ou musculaire, notamment l'insuffisance hépatique (D. Vincent).

Ajoutons à la cholinestérase une certaine importance pronostique, sa chute, du moins dans les cas chroniques, révélant une baisse grave de l'état général.

DEUXIÈME PARTIE

Recherches personnelles

« *Difficultatem facit doctrina* »
Quintilien X. III.

Plan de nos recherches personnelles.

Chapitre I. — Action du Buis et de ses diverses préparations sur la cholinestérase du sérum « in vitro ».

Technique du dosage.

Technique des diverses préparations du Buis.

Résultats expérimentaux :

Essais comparatifs de l'action inhibitrice des diverses parties du *Buxus sempervirens* L.

Essais comparatifs portant sur les feuilles de diverses espèces de *Buxus* et *Sarcococca.*

Essais comparatifs de diverses préparations obtenues à partir du Buis (décoction, infusion, extrait, etc...).

Chapitre II. — Action du Buis « in vivo ».

Expériences sur le cobaye.

Etude pharmacodynamique sommaire sur le chien.

Chapitre III. — Une application pratique : une méthode de détection biochimique du Buis, application à la falsification de la bière par addition de Buis.

Conclusions.

CHAPITRE PREMIER

ACTION DU BUIS ET DE SES DIVERSES PREPARATIONS SUR LA CHOLINESTERASE DU SERUM « IN VITRO ».

Technique du dosage.

Nous avons employé pour nos recherches une méthode alcalimétrique de dosage de la cholinestérase, inspirée de Stedman et White [126] et déjà utilisée par D. Vincent et Mlle A. Maugein [138] dans leurs recherches sur la fève de Calabar et le dosage biochimique de l'ésérine, par D. Vincent et P. Beaujard [132] dans celles sur les alcaloïdes inhibiteurs de la cholinestérase et par D. Vincent et P. Brygoo [133, 1] dans celles sur le pouvoir cholinestérasique du sérum dans la syphilis et ses rapports avec les médicaments arsenicaux.

Principe. — Cette méthode consiste à titrer au thermostat à 37°-38° en fonction du temps, de cinq minutes en cinq minutes pendant vingt minutes, au moyen d'une solution titrée de NaOH et en présence d'un indicateur, l'acidité libérée par l'hydrolyse d'une solution d'acétylcholine par le sérum.

L'indicateur coloré utilisé est le rouge de Crésol qui vire au rose pâle pour un pH = 8, 0 et qui devient jaune au-dessous ainsi on ne dépasse pas le pH = 8, 0 et la réaction cholinestérasique peut s'effectuer dans une zone optimum de pH. On évite ainsi que l'hydrolyse spontanée

de l'acétylcholine devienne trop intense et se confonde avec l'activité fermentaire elle-même.

L'inhibition cholinestérasique se traduit par un volume moindre de solution titrée de NaOH à ajouter, et, de cette façon, on peut calculer facilement le pourcentage d'inhibition pour les essais effectués, avec des préparations de la drogue à étudier et à des concentrations judicieusement échelonnées, par rapport à l'essai témoin fait avec le sérum et la solution d'acétylcholine seuls.

Appareils et réactifs nécessaires.

Matériel :

— Un thermostat (électrique ou bien au gaz) réglable à 38°-40° pourvu d'un dispositif en ratelier permettant le maintien dans l'eau de petits ballons immergés jusqu'au col, et de les retirer facilement et rapidement.

— Une série de burettes graduées au 1/20 de cm^3.

— Une série d'éprouvettes graduées de 50 cm^3.

— Une série de ballons d'une contenance de 100 cm^3 environ.

— Des pipettes de 1, 2, 5 et 10 cm^3.

— Un chronomètre ou minumètre type Jouan par exemple.

Réactifs :

Solution de chlorure d'acétylcholine (1) à 2°/°°. On peut utiliser les ampoules d' « Acécoline » à 0 gr. 20 en dissolvant le contenu d'une ampoule dans 100 cm^3 d'eau distillée bouillie.

— Solution de rouge de Crésol à 0,02 °/₀.

(1) Nous remercions vivement M. le Directeur des Laboratoires Lematte et Boinot, pour la grande obligeance avec laquelle il nous a fourni des quantités importantes de chlorure d'acétylcholine pour nos recherches.

On dissout :

0 gr. 10 de rouge de Crésol Merck dans :

5 cm³ d'une solution de NaOH 0,05 N puis on ajoute de l'eau distillée bouillie q.s.p. 500 cm³.

— Solution de NaOH, 0.01 N non carbonatée, conservée en flacon émeri et bien bouché ; elle se prépare à partir d'une solution-mère de soude N par dilution avec de l'eau distillée bouillie.

— Tampon à pH. = 8,0 au borate de Clark préparé avec :

5 cm³ 5 solution de borate (12 gr. 404 d'acide borique dans 100 cc NaOHⁿ puis dilution à 1 litre).

4 cm³ 5 de ClH à 0, 1N.

— Eau distillée bouillie, conservée en flacons soigneusement bouchés.

— Sérum de cheval, sans hémolyse, car l'hémoglobine colorerait le sérum, effet qui gênerait dans l'appréciation du virage, voire même en rendrait impossible la détermination.

— Enfin les solutions à étudier progressivement diluées, des préparations galéniques de Buis.

Mode opératoire :

La technique repose sur le protocole suivant :

On a disposé sur la surface d'une paillasse : burettes graduées au 1/20 de cm³, éprouvettes de 50 cm³ et ballons de contenance de 100 cm³ environ, en nombre égal, Nous aurons autant de groupe de 3 (burette, éprouvette et ballon) que d'expériences projetées. Leur nombre varie de 7 à 8 au grand maximum.

Les burettes contiennent la solution de NaOH 0,01 N.

Dans chaque éprouvette de 50 cm³ numérotée on introduit : 10 cm³ de la solution de chlorure d'Acétylcholine à 2°/₀₀ ;

X gouttes de la solution de rouge de Crésol, l'indicateur ;

— le volume désiré des dilutions des préparations galéniques de Buis à étudier, sauf dans l'éprouvette-témoin.

— Quelques gouttes de la solution titrée NaOH 0,01 N pour amener les liquides au pH = 8,0 (coloration rose).

— On complète à 49 cm^3 par de l'eau distillée bouillie froide.

— On transvase le contenu de ces éprouvettes dans les ballons respectifs numérotés que l'on porte au thermostat à 38° où on les abandonne pendant dix minutes pour que se réalise l'équilibre de température.

— On ajoute alors 1 cm^3 de sérum de cheval, on ramène rapidement à pH = 8, 0 en prenant soin de comparer la coloration avec celle du tampon au borate de Clark, on replace au thermostat chaque ballon. On note l'heure. On ramène ensuite toutes les burettes au zéro.

Ici se terminent les opérations préliminaires du dosage proprement dit.

Après cinq minutes, on exécute le premier dosage par affusion de la solution titrée NaOH 0,01 N jusqu'au virage rose (pH = 8,0). On reporte au thermostat pour un autre temps de cinq minutes.

On répète cette opération de cinq minutes en cinq minutes pendant vingt minutes, en ayant soin qu'à chaque ballon corresponde la même burette.

La quantité de NaOH 0,01 N utilisée durant ces vingt minutes est notée. On sait que le dernier chiffre de la série correspond à l'hydrolyse spontanée de l'acétylcholine dans les conditions de l'expérience.

La valeur d'inhibition dans un essai donné est égale à la quantité T de NaOH 0,01 N utilisée pour l'épreuve-témoin diminuée de la quantité n de NaOH 0,01 N trouvée pour l'essai : (T — n).

Il conviendra, pour calculer le pourcentage d'inhibition, de tenir compte de la légère hydrolyse spontanée de l'acétylcholine, déterminée par un essai préalable sans sérum,

TABLEAU I

Ballons numérotés	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII (1)
Solution d'Acétylcholine à 2 °/₀₀ (en cm³)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Solution de rouge de Crésol à 0 gr. 02°/°° (en gouttes)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Décoction — Dilution	Dilution mère		Dilut. mère dil. 1/10			Dilut. mère dil. 1/100			Dilut. mère dil. 1/1.000		Dilut. mère dil. 1/10.000	Témoin
Décoction — qté cm³	1	0, 5	2, 5	1	0, 5	2, 5	1	0, 5	1	0, 5	1	0
Sérum (en cm³)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Valeur en cm³ de solution NaOH 0,01 N nécessaire après 20 minutes	0, 50	0, 65	1	1, 4	2	2, 7	3, 7	4, 30	5, 05	5, 35	6, 15	6, 4
Volume définitif de solution NaOH 0,01 N après correction de l'hydrolyse spontanée de l'Acétylcholine	0, 10	0, 25	0, 6	1	1, 6	2, 3	3, 3	3, 9	4, 65	4, 95	5, 65	6
Différence (T-n) en cm³.	5, 9	5, 75	5, 4	5	4, 4	3, 7	2, 7	2, 3	1, 35	1, 05	0, 35	
Pourcentage d'inhibition	98	95	90	83	73	61	45	38	22	17	< 6	
Poids correspondant en plantes fraîches (en gr.) dans l'essai (vol. total 50 cm³)	100	50	25	10	5	2, 5	1	0, 5	0, 1	0, 05	0, 01	

(1) Notons que l'essai ci-dessus a été fait en deux séries vu l'impossibilité de titrer en même temps 12 échantillons.

dans les mêmes conditions de temps et de température, la correction a apporter correspond à 0,4 cm^3 de NaOH 0,01 N. Cette correction n'affecte évidemment en rien la valeur (T — n) mais seulement le chiffre T indispensable pour ce calcul.

Calcul du pourcentage d'inhibition : $\frac{(T—n) \times 100}{(T — 0,4)}$

Il ne reste ensuite qu'à construire la courbe représentative

— en abcisses : le poids de plante,

— en ordonnées : le pourcentage d'inhibition.

A l'appui de cet exposé, nous résumons, comme exemple, en un tableau les résultats trouvés avec la décoction de feuilles fraîches de *Buxus sempervirens* L en présence du sérum de cheval (Tableau I)

Valeur de cette méthode.

Il est nécessaire :

a) d'opérer sur du sérum de cheval homogène, frais et non hémolysé, le sérum ne doit contenir aucune substance chimique étrangère, soit pour le conserver, soit provenant de traitements antérieurs de l'animal.

b) d'avoir des réactifs identiques et de n'utiliser que de l'eau distillée bouillie, après ébullition prolongée, pour éliminer complètement le CO_2.

c) d'opérer à température constante entre 37°-39°.

d) de ne jamais dépasser un pH. = 8,0 lors des affusions de la solution alcaline.

Il est à signaler que certains rouges de Crésol commerciaux auraient une action perturbatrice pendant le dosage. Avec le rouge de crésol que nous avons utilisé (Kresol-rot Merck) nous avons toujours obtenu de bons résultats.

Technique des diverses préparations de buis.

Nous nous sommes adressés pour notre étude aux genres :
— *Buxus sempervirens* Linné,
— *Buxus balearica* Wildenow,
en utilisant les parties de plantes fraîches suivantes : feuilles et tiges, écorce, sciure de bois, fruits, et la poudre de feuilles sèches.

Nous avons préparé des décoctions (feuilles et tiges, écorce, sciure, fruits), des infusions (feuilles et tiges), une teinture (feuille), des extraits (feuilles et tiges). La technique de leurs préparations nous est dictée par notre Codex [22].

La décoction est un mode de solution extractive qui consiste à soumettre les drogues à l'action d'un liquide bouillant pendant un temps plus ou moins long. Le liquide obtenu est appelé décocté, décoctum et décoction.

Pour effectuer l'opération, nous avons utilisé les parties de plantes, telles feuilles, écorce ou fruits, convenablement coupées en fines languettes puis écrasées au mortier ou bien la poudre de feuilles que nous avons fait bouillir dans un récipient avec de l'eau distillée pendant un temps déterminé, de façon que :

10 cm^3 de décocté correspondent à 1 gr. de plante fraîche.

L'infusion est une méthode de solution qui consiste à verser un liquide bouillant sur une substance médicamenteuse, afin d'en extraire les parties solubles, le produit obtenu est appelé infusé, infusium ou infusion.

Les parties de plantes utilisées, préalablement coupées en fines tranches et passées au mortier, ont été placées dans un récipient approprié sur lesquelles nous avons versé la quantité voulue d'eau distillée bouillante, le vase a été laissé couvert pendant un temps déterminé, puis le liquide filtré.

10 cm³ d'infusé correspondent à 0 gr. 10 de plante fraîche.

Les teintures alcooliques ou alcoolés proprement dits sont des médicaments liquides obtenus en traitant par l'alcool et par un mode opératoire déterminé, des substances végétales ou animales sèches, même des produits chimiques.

La poudre de *Buxus sempervirens* L (1) a été traitée par lixiviation suivant la méthode de notre Codex avec de l'alcool à 70°.

Le poids de teinture obtenue doit être égal à dix fois le poids de poudre traitée.

« On donne le nom d'extrait au produit de l'évaporation jusqu'à un degré déterminé, d'une solution obtenue en traitant une substance végétale par un véhicule vaporisable tel que l'eau, l'alcool, l'éther » (Codex 1908).

Nous nous sommes.adressés à l'extrait aqueux. Le liquide extractif est obtenu à l'aide de l'un des procédés de dissolution : la décoction. Le décocté est ensuite concentré. Le procédé de concentration utilisé consiste dans l'emploi du bain-marie. Il nous est alors facile d'arrêter cette concentration à un taux déterminé puisque notre décoctum est à 10% de plante.

Résultats expérimentaux.

Nous donnerons nos résultats en 3 groupes :

1. Essais comparatifs de l'action inhibitrice des diverses parties de *Buxus sempervirens* L.

2. Essais comparatifs portant sur les feuilles des diverses espèces de *Buxus* et *Sarcococca.*

3. Essais comparatifs de diverses préparations obtenues à partir du Buis (infusion, décoction, extrait, etc...).

(1) Nous exprimons notre reconnaissance à M. le Directeur des Etablissement Jourdan à Lyon d'avoir bien voulu nous fournir de la poudre de *Buxus Sempervirens* L.

I. — *Action des diverses parties de* Buxus sempervirens *L sur la cholinestérase du sérum.*

Les essais rapportés ici ont été faits sur des feuilles et rameaux récoltés en novembre et décembre 1945.

Nous avons utilisé la décoction de plante fraîche pour les feuilles et les tiges, selon le mode opératoire décrit plus haut. Les expériences faites sur les écorces et sur le bois portaient sur des produits longuement desséchés.

Les fruits provenaient d'un lot récolté en novembre 1946. Dans tous les cas, on opérait sur la décoction de telle façon que 10 cm³ correspondent à 1 gr. de plante.

Un essai préliminaire nous ayant montré que l'inhibition était intense, des quantités progressivement décroissantes de ces préparations ont été étudiées pour en mesurer l'effet inhibiteur anticholinestérasique sur une plus large échelle.

Le tableau suivant donne les résultats numériques de cette série d'essais.

TABLEAU II

Partie de la plante employée	Valeur de l'inhibition observée (pourcentage d'inhibition) — sérum de cheval —										
Feuilles et rameaux terminaux	98	96	89	83	75	61	44	34	24	17	< 5
Ecorce (de grosses tiges)	93	91	87	82	74	59	29	18	8	5	
Bois (sciure de Buis)	<10										
Fruits	75	69	45	24	<10						
Poids de plante correspondant en milligr. dans l'essai (vol. 50 cm³)	100	50	25	10	5	2,5	1	0,5	0,1	0,05	0,01

Ainsi qu'on le voit, les feuilles forment les parties de plante les plus actives mais elles dépassent de bien peu l'effet obtenu avec l'écorce. Même à la très faible concentration de un milligramme dans les 50 cm³ de volume total de l'essai, l'inhibition cholinestérasique provoquée par les

feuilles est encore relativement intense (44%). L'inhibition atteint et dépasse même 80% pour 10 milligrammes.

Par contre, les fruits sont notablement moins actifs, ne donnant que 45% d'inhibition pour une dose de 25 milligrammes et 24% pour 10 milligrammes.

La sciure de bois de Buis est à peu près totalement dépourvue d'action anticholinestérasique même aux plus fortes doses.

Les essais ci-dessus indiqués ont été faits avec le sérum de cheval comme source d'enzyme.

Nous avons aussi, avec les feuilles de Buis seulement, étudié leur effet sur la cholinestérase du sérum humain.

Les résultats ont été les suivants :

TABLEAU III

Partie de plante employée	Valeur de l'inhibition observée (pourcentage d'inhibition) (Sérum humain)										
Feuilles (Buxus Sempervirens) décoction	96	91	84	73	67	56	39	28	12	7	< 5
Poids de plante correspoàdant en milligr. dans l'essai (vol. 50 cm³.) ...	100	50	25	10	5	2, 5	1	0, 5	0, 1	0, 05	0, 01

Ainsi l'activité inhibitrice des feuilles de Buis s'exerce vis-à-vis de la cholinestérase du sérum humain de façon semblable à celle observée sur le sérum de cheval. Les différences sont peu intenses.

Il s'agit d'ailleurs d'enzymes répondant au même type de cholinestérase.

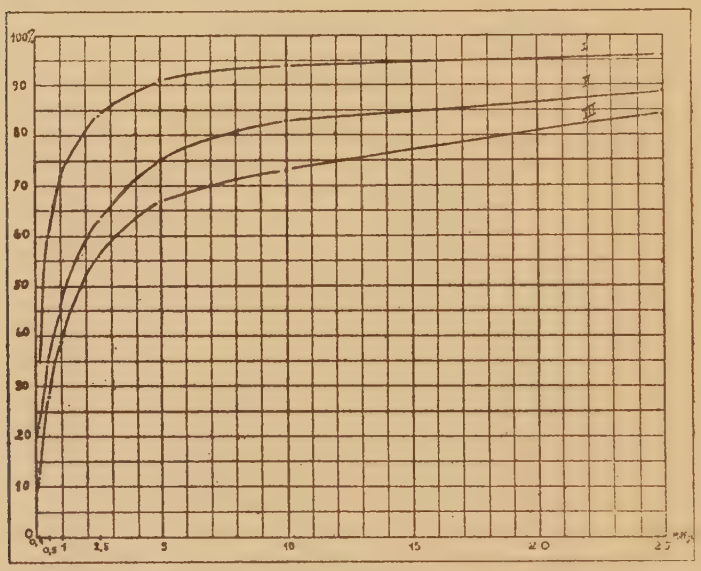
En ce qui concerne les feuilles de Buis dans leur effet sur la cholinestérase du sérum nous confirmons donc ici, les résultats déjà apportés par D. Vincent et Mlle Mathou (1945) [137] aussi bien sur le sérum de cheval que sur le sérum humain.

Le Buis constitue donc un inhibiteur puissant de la cholinestérase sérique : à la concentration de 1/50.000 de plante totale, la cholinestérase est encore inhibée de près de 50%.

En ce qui concerne les fruits, leur activité est relativement peu intense. Il s'agissait de fruits recueillis bien mûrs, la déhiscence étant accomplie. Or, les réactions microchimiques des alcaloïdes sur le fruit mûr de *Buxus sempervirens* L, ne peuvent être obtenues selon Mlle Mathou [87, 2]. L'activité réduite du fruit indique que les principes actifs y sont en bien moins grande abondance que dans les feuilles ou l'écorce.

GRAPHIQUE MONTRANT LA VALEUR INHIBITRICE DE LA CHOLINESTÉRASE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION

Valeur de l'inhibition observée (pourcentage observé).



I. — Buxus balearica Wild — Sérum de cheval.
II. — Buxus sempervirens L — Sérum de cheval.
III. — Buxus sempervirens L — Sérum humain.

Poids de plante fraîche dans l'essai (volume 50 cm³.).

II. — *Etude comparée de l'effet inhibiteur des feuilles de diverses espèces de* Buxus *et* Sarcococca.

Il nous a semblé intéressant de comparer du point de vue de l'effet anticholinestérasique l'action de diverses

espèces de Buis. Nous avons étudié à ce point de vue : *Buxus sempervirens* L. et *Buxus balearica* Wild récoltés par nous à Toilouse et soumis à une dessication complète.

Nous y avons ajouté *Buxus longifolia* Boissier, le Buis de Syrie, qui, selon Mlle Mathou [87, 1] se rattache à *Buxus balearica* Wild, surtout par son appareil secréteur. Nous avons opéré sur des échantillons de ce Buis conservés au laboratoire d'Histoire Naturelle de la Faculté de Médecine et Pharmacie de Toulouse (1).

Enfin nous rapportons quelques déterminations faites sur les feuilles de *Sarcococca pruniformis* Lind, provenant du Jardin Botanique de Toulouse, espèce qui, ainsi que nous l'avons dit plus haut, se rapproche des *Buxus*.

Dans tous les cas, nous avons utilisé la décoction de feuilles.

Le tableau ci-dessous indique les résultats obtenus avec les feuilles de ces diverses espèces.

TABLEAU IV

Espèce étudiée	Valeur de l'inhibition observée (pourcentage d'inhibition) — Sérum de cheval —										
Buxus Sempervirens L (feuilles)	91	88	71	60	54	47	35	21	10	8	< 5
Buxus Balearica Wild. (feuilles)	94	93	91	89	83	73	58	45	17	12	7
Buxus Longifolia Bois. (feuilles).....	88	86	84	82	78	72	48	25			
Sarcococca Pruniformis Lind. (2) (feuilles)	58		45	16	13						
Poids de plante sèche correspondant en milligr. dans l'essai (vol. 50 cm³.)	100	50	25	10	5	2, 5	1	0, 5	0, 1	0, 05	0, 01

La comparaison de l'effet inhibiteur de ces quelques

(1) Nous remercions bien vivement Mme Dulucq-Mathou qui a bien voulu très aimablement mettre à notre disposition ces échantillons pour nos essais.

(2) Notons que pour *Sarcococca*, il s'agissait de feuilles fraîches.

espèces montre que l'inhibition la plus forte est donnée par *Buxus balearica* Wild. qui est notablement plus actif que *Buxus sempervirens* L. Dans cette constatation nos données viennent s'ajouter aux observations de Martin Sans et Pouchet [84, 85], ainsi qu'à celles de Mlle Mathou [87, 2] qui ont par la méthode de caractérisation microchimique constaté que *Buxus balearica* Wild. présente en toutes ses parties : racines, tiges, feuilles, une nette supériorité vis-à-vis de *Buxus sempervirens* L, quant à sa richesse en alcaloïdes,

Nous voyons d'autre part que *Buxus longifolia* Bois., est fortement actif. Il se range à ce point de vue entre *Buxus balearica* Wild. et *Buxus sempervirens* L. quant à *Sarcococca pruniformis* Lind. il est doué d'un pouvoir anticholinestérasique modéré et on peut estimer que son pouvoir inhibiteur est environ dix fois moins puissant que celui de *Buxus sempervirens* L. Néanmoins, il est encore considérable et il est intéressant de noter que le pouvoir anticholinestérasique n'est pas, dans les Buxacées, étroitement cantonné dans le genre *Buxus* mais qu'on peut l'observer, bien qu'avec moins d'intensité, dans un genre différent. Malheureusement il ne nous a pas été possible de poursuivre plus avant cette investigation dans les autres genres de cette même famille.

III. — *Essais comparatifs des diverses préparations de Buis sur la cholinestérase du sérum.*

Pour compléter les données que nous venons de préciser sur le pouvoir anticholinestérasique du Buis *in vitro*, nous avons voulu, nous plaçant ici sur un plan plus strictement pharmaceutique, étudier les effets comparés de diverses préparations galéniques à base de *Buxus sempervirens* L. Mise à part la décoction qui a servi de matière première aux expériences précédentes, nous avons étudié : l'infusion, la teinture (alcool à 70°), l'extrait.

De plus, nous avons étudié le bloc alcaloïdique total ainsi qu'un échantillon de sulfate de buxine que nous devons à l'amabilité du Dr Raymond Hamet.

Préalablement, nous avons cru intéressant de rechercher l'effet de la dessication à 100° des feuilles de Buis sur le comportement de ses principes actifs décelés par la mesure de l'action inhibitrice sur la cholinestérase sérique. Des feuilles de *Buxus sempervirens* L. et de *Buxus balearica* Wild. ont été traitées par décoction, à l'état frais d'une part, après passage à l'étuve à 100° pendant 24 heures d'autre part.

La dessication prolongée à 100° des feuilles de Buis ne fait pas disparaître leur pouvoir anticholinestérasique mais il l'amoindrit dans une certaine mesure. Ce fait est établi par les résultats numériques ci-dessous

TABLEAU V

Préparation essayée	Valeur de l'inhibition observée (pourcentage d'inhibition) — Sérum de cheval —										
I. — Décoction de feuilles fraîches											
Buxus sempervirens L.	98	96	89	83	76	62	45	35	22	17	< 5
Buxus Balearica Wild . . .	<98	97	96	94	91	84	72	60	18	16	12
Poids correspondant de plante fraîche en millig. dans l'essai	100	50	25	10	5	2,5	1	0,5	0,1	0,05	0,01
II. — Décoction de feuilles désséchées à 100°											
Buxus Sempervirens L.	90	82	69	60	54	46	34	20	8	6	< 5
Buxus Balearica Wild. . . .	96	94	92	89	82	72	57	43	17	12	7
Poids correspond[t] de plante sèche dans l'essai (en milligr.) (vol. 50 cm[3].)	100	50	25	10	5	2,5	1	0,5	0,1	0,05	0,01

Pour établir la valeur relative des diverses préparations, nous donnons d'une part, des résultats portant comparaison entre infusion et décoction obtenues sur des feuilles fraîches de Buis.

D'autre part, nous étudions comparativement les diverses préparations obtenues à partir de la poudre sèche de feuilles de *Buxus sempervirens* L. (non passée à l'étuve à 100°). Cette poudre nous a servi à faire décoction, infusion, teinture et extrait aqueux que nous avons titré en présence de sérum de cheval comme source de cholinestérase.

a) *Essai de la décoction et de l'infusion de feuilles fraîches.*

TABLEAU VI

Préparation essayée	Valeur de l'inhibition observée (pourcentage d'inhibition) Sérum de cheval				
Infusion de feuilles fraîches :					
Buxus Sempervirens L.	71	59	46	27	15
Buxus Balearica Wild.	93	87	80	68	53
Décoction de feuilles fraîches :					
Buxus Sempervirens L.	83	75	61	44	34
Buxus Balearica Wild.	95	91	84	72	60
Poids correspondant de plante fraîche dans l'essai (vol. 50 cm³.) en milligr.	10	5	2, 5	1	0, 5

Ainsi, dans l'essai précédent, si l'infusion s'est révélée moins active que la décoction pour *Buxus sempervirens* L., elle l'a été autant pour *Buxus balearica* Wild., lequel ici confirme encore sa supériorité d'activité déjà indiquée plus haut par rapport à *Buxus sempervirens* L.

b) *Essai de la décoction, de la teinture, de l'extrait aqueux de la poudre sèche de feuille de* Buxus sempervirens L.

TABLEAU VII

Préparation utilisée	Valeur de l'inhibition observée (pourcentage d'inhibition) — Sérum de cheval —										
Décoction	95	88	81	75	71	56	36	23	15	8	< 5
Teinture	96	89	87	79	73	66	56	47	30	25	16
Extrait	98			81	71	60	52				
Poids correspondant de plante sèche dans l'essai (en milligr.) (vol. 50 cm³)	100	50	25	10	5	2, 5	1	0, 5	0, 1	0, 05	0, 01

On observe donc que les trois préparations essayées sont d'une activité à peu près semblable.

L'inhibition notée est du même ordre, du moins aux erreurs expérimentales près. La teinture paraît cependant la plus active.

Enfin, les essais précédents ayant été pratiqués sur des préparations totales, il ne nous a pas semblé sans intérêt d'étudier, au moins sommairement, l'effet inhibiteur des « principes actifs » du Buis. On en sait la complexité. Aussi, sans prétendre ici apporter une étude détaillée de ces alcaloïdes, ne donnons-nous que les résultats de quelques séries d'essais faits sur les alcaloïdes totaux extraits à partir de *Buxus sempervirens* L. et, de plus, avec du sulfate de buxine.

Les alcaloïdes totaux ont été extraits de la manière suivante selon deux procédés, l'un utilisant l'éther, l'autre le mélange éthero-chloroformique : traitement de la poudre de feuilles de Buis par une solution de carbonate de sodium pour l'humecter ; dessication, puis lixiviation à l'éther ou au mélange éthero-chloroformique (3 parties d'éther pour une partie de chloroforme) ; séparation des liquides de lixiviation et traitement par une solution d'acide sulfurique à 5%, lavages à la solution acide ; reprise de cette dernière par l'éther ou le mélange éthero-chloroformique après alcalinisation par le carbonate de sodium ; nouveaux lavages à l'éther et enfin évaporation des solutions éthérées et éthéro-chloroformiques en capsules tarées.

Au cours de ces diverses opérations, des vérifications fréquentes au réactif de Bouchardat et au réactif silico-tungstique permettaient de reconnaître que le passage des alcaloïdes s'effectuait aussi complètement que possible d'un solvant dans un autre.

Les alcaloïdes ainsi otenus ont été essayées vis-à-vis de la cholinestérase du sérum de cheval, à des concentrations croissantes de 5 γ à 5.000 γ pour le volume total de l'essai c'est-à-dire 50 cm^3.

Les résultats sont donnés dans le tableau suivant :

TABLEAU VIII

Produit essayé	Valeur de l'inhibition observée (pourcentage d'inhibition) — Sérum de cheval —									
Bloc alcaloïdique I (extrait à l'éther)	96	93	90	87	82	76	69	60	37	19
Bloc alcaloïdique II (extrait à l'éther chloroformé)	97	95	92	89	85	81	75	66	41	22
Poids de substance dans l'essai (vol. 50 cm³.) en γ	5000	2500	1000	500	250	100	50	25	10	5

Voici d'autre part les résultats donnés par les essais faits sur le sulfate de buxine, que nous mettons à part, du fait, qu'il s'agit d'un produit de collection qui n'a pas été extrait par nous et qui est de date déjà ancienne.

TABLEAU IX

Produit essayé	Valeur de l'inhibition observée (pourcentage d'inhibition) — Sérum de cheval —					
Sulfate de buxine	80	60	47	27	18	5
Poids de substance dans l'essai (vol. 50 cm³.) en γ	5000	2500	1000	500	250	100

D'après ces résultats on peut observer qu'en ce qui concerne les rapports d'activité anticholinestérasique de la poudre totale sèche de feuille de Buis et des alcaloïdes, en se référant au poids d'alcaloïdes extraits, — qui fut de 0,40 à 0,50% — l'ordre de grandeur de l'inhibition obtenue est semblable.

Dans ces conditions, les alcaloïdes peuvent donc être considérés comme les principes actifs inhibiteurs de la cholinestérase contenus dans le Buis.

Ces résultats sont du moins valables dans le cas de la

poudre de feuilles desséchées. Toutefois, si l'on compare les activités des alcaloïdes extraits de la plante fraîche, on note une activité proportionnellement plus forte de la part de la plante fraîche, tandis que la discordance n'est plus retrouvée si l'on compare avec la plante desséchée, compte tenu, bien entendu, de la perte en eau.

Notons aussi que le bloc alcaloïdique extrait par l'éther seul se révèle légèrement moins actif que celui donné par l'extraction au mélange éthéro-chloroformique. Peut être celà tient-il au fait que l'un des alcaloïdes ne se laisse pas aussi bien dissoudre par l'éther que par le chloroforme et on peut penser qu'il s'agit d'une fraction alcaloïdique particulièrement active.

Enfin la buxine elle-même (sulfate de buxine) apparaît beaucoup moins active que le bloc alcaloïdique total. Sans doute la buxine n'est-elle pas tout le principe actif du Buis. On doit cependant remarquer que la buxine étudiée était fortement colorée en jaune et était un échantillon ancien de collection dont nous ne pouvons pas affirmer qu'il n'ait pas subi à la longue des processus d'oxydation responsables d'une diminution d'activité.

Il n'en reste pas moins que les alcaloïdes du Buis, considérés en bloc, sont des inhibiteurs très puissants de la cholinestérase du sérum. En effet, à la concentration de 50 γ dans l'essai (50 cm^3) c'est-à-dire de 10^{-6} ils provoquent une inhibition qui atteint 70% et atteint encore 20% à la concentration encore plus faible de 10^{-7}.

CHAPITRE II

ACTION DU BUIS « IN VIVO »

Nous avons voulu compléter l'étude du Buis *in vitro* précédemment effectuée, par quelques essais pratiqués *in vivo*, dans le but de nous rendre compte des perturbations apportées dans l'organisme animal par l'effet inhibiteur très intense qu'il provoque sur la cholinestérase. Sommairement au moins nous avons voulu voir dans quelle mesure ses effets se manifestent *in vivo*, soit sur la cholinestérase du sérum de l'animal étudié, soit sur les effets physiologiques des « médiateurs chimiques » : acétylcholine et adrénaline. Le premier groupe d'expériences a été fait sur le cobaye, le second sur le chien.

I. — Expériences sur le cobaye.

Protocole expérimental. — Les animaux étaient préalablement soumis à une ponction cardiaque. Une quantité de sang de 3 à 4 cm^3 était retirée, laquelle, après centrifugation, permettait sur le sérum, en utilisant 0 cm^3 5 ou 1 cm3 selon le cas, de faire un dosage témoin de l'activité cholinestérasique du sérum de l'animal en expérience. Le lendemain ou deux jours après, pour que l'animal ait le temps de réparer la spoliation sanguine due à la première ponction, on lui injectait le Buis sous forme d'extrait, L'injection était faite par voie sous-cutanée, l'extrait étant préalablement dilué dans le sérum physiologique. Une

heure après l'injection, une deuxième ponction cardiaque était faite. Après centrifugation le sérum servait au dosage de la cholinestérase.

Dans une première série d'essais quatre cobayes ont reçu par voie sous-cutanée une quantité d'extrait de Buis correspondant à 0 gr. 10 ou 0 gr. 20 de plante sèche par kilog. L'injection fut parfaitement bien supportée, aucun trouble caractéristique ne se manifesta. Les dosages de cholinestérase sur le sérum ne permirent de déceler aucune inhibition.

On peut donc dire que l'injection de 0 gr. 10 à 0 gr. 20 de Buis sous forme d'extrait, par voie sous-cutanée chez le cobaye, n'amène, après une heure environ, aucune perturbation de la cholinestérase du sérum. Il est vrai que dans ce cas la quantité injectée fut faible, ne correspondant qu'à une fraction de milligramme par cm^3. de sérum, à supposer que la diffusion se soit faite totalement. Or, d'après nos recherches *in vitro* une si faible quantité ne manifeste pas une forte inhibition sur la cholinestérase.

Aussi, dans une deuxième série, avons-nous utilisé des doses plus massives correspondant à 5 gr. et 20 gr. de plante sèche par kilog. La deuxième ponction fut faite là encore une heure après l'injection de l'extrait. L'inhibition cholinestérasique notée fut de 20% lorsque la dose de 20 gr. (plante sèche) avait été injectée. Dans les autres cas, elle était moins de 10%.

Dans ce cas encore les symptômes d'intoxications ne furent pas violents, malgré la grosse dose de Buis injectée. Au moment de la deuxième ponction les animaux ne paraissaient présenter aucun trouble si ce n'est une diminution de leur mobilité. Après 12 h. un des animaux seulement (ayant reçu 20 gr./kg.) était mort. C'était d'ailleurs celui dont la cholinestérase sérique était considérablement inhibée.

Enfin dans une troisième série, nous avons injecté des doses d'extrait hydro-alcoolique, obtenu à partir de la tein-

ture correspondant à 10 gr. et 20 gr. Ici les phénomènes toxiques furent beaucoup plus accusés que précédemment. La mort survint après un intervalle de 45 minutes à une heure. Sur le sang prélevé au moment de la mort, nous avons mis en évidence une baisse de l'activité cholinestérasique de 30 à 45%.

Il semble donc que le cobaye manifeste une résistance considérable vis-à-vis de la toxicité du Buis. Nous nous sommes demandé si le Buis inhibe *in vitro* la cholinestérase sérique du cobaye autant que celle du cheval. Quelques essais, faits au moyen du même extrait que nous avions injecté, nous ont montré que la cholinestérase du sérum de cobaye est proportionnellement moins sensible au Buis que celle du sérum de cheval.

Ainsi, alors que pour le sérum de cheval, en présence de 50 milligrammes de plante, l'inhibition est de 93%, elle n'est que de 84% pour le cobaye ; en présence de 10 milligrammes, elle est de 81% et 70% respectivement, et pour 1 milligramme, 60% et 28%. On peut donc considérer qu'il y a à la fois chez l'animal une inhibition moins intense et une diffusion incomplète de produit à partir du point d'injection.

II. — **Etude pharmacodynamique sommaire sur le chien.**

Il n'est pas dans notre but d'apporter une étude pharmacodynamique complète du Buis. Nous voulons cependant, en considérant le point de vue des rapports de l'effet pharmacodynamique avec l'inhibition cholinestérasique observée *in vitro*, donner quelques résultats expérimentaux obtenus par l'injection de Buis chez le chien. Ces résultats ont trait à l'effet du Buis sur la pression artérielle et la

respiration d'une part, sur l'action combinée du Buis avec l'acétylcholine ou l'adrénaline d'autre part (1).

A. — *Données sur l'action du Buis sur la pression artérielle et la respiration.*

Quelques expériences faites sur le chien chloralosé permettent d'établir que l'injection d'extrait de Buis dans la saphène provoque :

1° Une baisse marquée de la pression carotidienne qui se relève assez rapidement à son niveau primitif.

A la dose de 0 gr. 045 (de plante) par kg. l'hypotension ne persiste que quelques minutes (voir graphique II). A la dose de 0 gr. 225 par kg. elle est beaucoup plus durable (graphique I). Cette hypotension est habituellement précédée d'une très légère flèche hypertensive.

2° Sur les mouvements respiratoires, cette injection permet d'observer habituellement mais de façon moins constante une augmentation notable de l'amplitude et de la fréquence.

B. — *Action combinée du Buis et de l'acétylcholine ou de l'adrénaline.*

Dans ces essais nous avons voulu voir les modifications éventuelles de l'hypotension acétylcholinique et de l'hypertension adrénalinique, après injection préalable d'extrait de Buis au chien chloralosé. Les injections d'acétylcholine étaient de 0mgr.07 par kilog., celles d'adrénaline de 0 mgr. 005 par kg., les unes et les autres faites à la saphène, sous forme de dilution dans le sérum physiologique.

Nous avons noté que, contrairement à ce qu'on était en

(1) Nous remercions bien vivement M. le Professeur Sendrail, dans le laboratoire duquel cette expérimentation a été faite, ainsi que M. Maury, qui nous a aidé pour nos enregistrements.

droit d'attendre, l'injection préalable de Buis n'augmente pas les effets hypotenseurs de l'acétylcholine. On constate même, paradoxalement, plutôt une diminution de ces effets (graphique II). En ce qui concerne l'hypertension adrénalinique, elle n'est pas sensiblement modifiée par l'injection de Buis (graphique III). Nous avons enfin vu que l'injection simultanée d'extrait de buis et d'acétylcholine provoque une hypotension qui est du même ordre que celle donnée par l'injection d'une seule de ces substances, sans qu'il y ait addition de leurs effets (graphique II).

C. — *Action comparée de l'extrait de Buis et des alcaloïdes sur la pression artérielle du chien.*

Nous avons observé par des injections successives d'extrait de Buis et d'alcaloïdes totaux que nous avions isolés à partir du Buis que l'extrait manifeste à dose sensiblement correspondante, une action hypotensive beaucoup plus intense que les alcaloïdes eux-mêmes.

Ainsi pour prendre un exemple concret, l'extrait de Buis, à la dose correspondant à 0 gr. 05 de plante sèche par kilog. donne une forte hypotension, tandis que les alcaloïdes totaux aux doses de 0 mgr. 25 et de 1 mgr. par kilog. qui correspondent, à raison de 0,50 % d'alcaloïdes (comme nous l'avons trouvé dans nos dosages), à 0 gr. 05 et à 0 gr. 20 de plante sèche par kilog. sont absolument dépourvus d'effet hypotenseur. Une injection ultérieure d'extrait à cette dernière dose a montré que l'animal réagissait encore intensément à l'extrait (graphique IV).

Il y a donc une discordance marquée entre l'action des alcaloïdes et celle de l'extrait total, cette discordance est d'ailleurs assez surprenante puisque, ainsi que nous l'avons vu, les alcaloïdes inhibent la cholinestérase à peu près autant que l'extrait. On sait d'ailleurs qu'il existe d'assez nombreux exemples de faits analogues en pharmacologie et dans le cas particulier du Buis, il semble bien établi que

la plante est porportionnellement beaucoup plus toxique que la buxine dont la dose léthale pour le chien est d'après Couzen, cité par Lewin [73] de 0 gr. 80.

Que peut-on conclure de ces diverses recherches sur les rapports de l'activité anticholinestérasique du Buis avec ses propriétés pharmacodynamiques ?

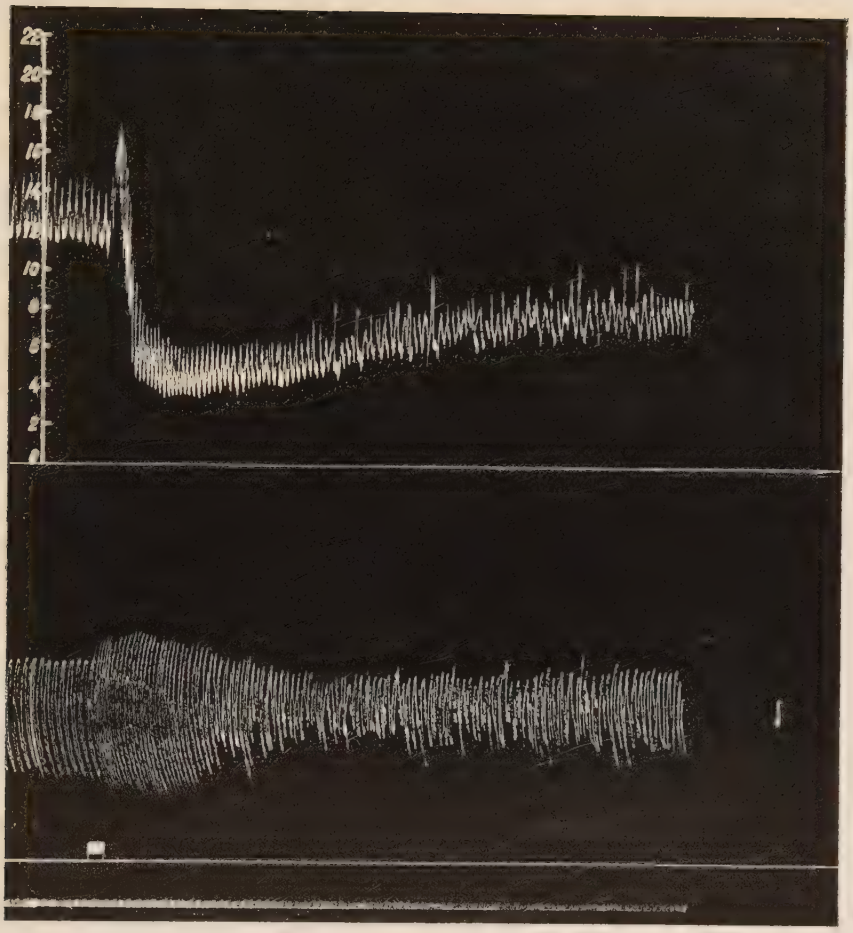
D'abord l'action hypotensive de type vagotonique est bien conforme à ce qu'on peut attendre d'une drogue, qui, inhibant la cholinestérase, doit favoriser l'effet de l'acétylcholine surtout libérée intensément aux terminaisons vagales. Mais, d'autre part, des faits plus difficiles d'interprétation ont été observés, notamment celui de la non augmentation des effets de l'acétylcholine par le Buis et celui aussi de la discordance de l'action des alcaloïdes par rapport à l'extrait, alors que tous deux inhibent intensément la cholinestérase. A ce propos, sans vouloir conclure, nous nous contenterons de faire remarquer que nous n'avons étudié l'effet du Buis que sur la cholinestérase du sérum et que rien ne prouve péremptoirement tant que l'expérience ne l'a pas démontré, que l'effet est le même sur les cholinestérases des centres et que les discordances et concordances notées s'y retrouvent de façon identique.

Au surplus, nous touchons ici à des problèmes d'une extrême complexité, concernant les substances à potentiel multiple « amphomimétiques » comme les appelle Danielopolu.

L'activité de la cholinestérase n'est pas tout dans le phénomène de médiation cholinergique, il faut, en outre, distinguer, dans le mode d'action de certaines drogues à ce point de vue, deux effets : l'un anticholinestérasique, inhibiteur fermentaire, l'autre sensibilisateur cellulaire à l'acétylcholine. Ces deux effets peuvent coexister le plus souvent. Souvent aussi l'un prédomine largement sur l'autre. Parfois même il peut exister une dissociation complète, une substance fortement inhibitrice de la cholinestérase pouvant paradoxalement et au moins à certaines doses dimi-

nuer ou supprimer la sensibilité à l'acétylcholine. Un fait de cet ordre a été indiqué par D. Vincent et Mlle Séro à propos de l'Iboga [142] et Scheiner [118] a observé récemment un comportement analogue pour l'iodo-méthylate de β-naphtyl-quinoléine et pour l'ésérine elle-même à très forte dose, sur le muscle de la grenouille, qui perd alors sa sensibilité à l'acétylcholine.

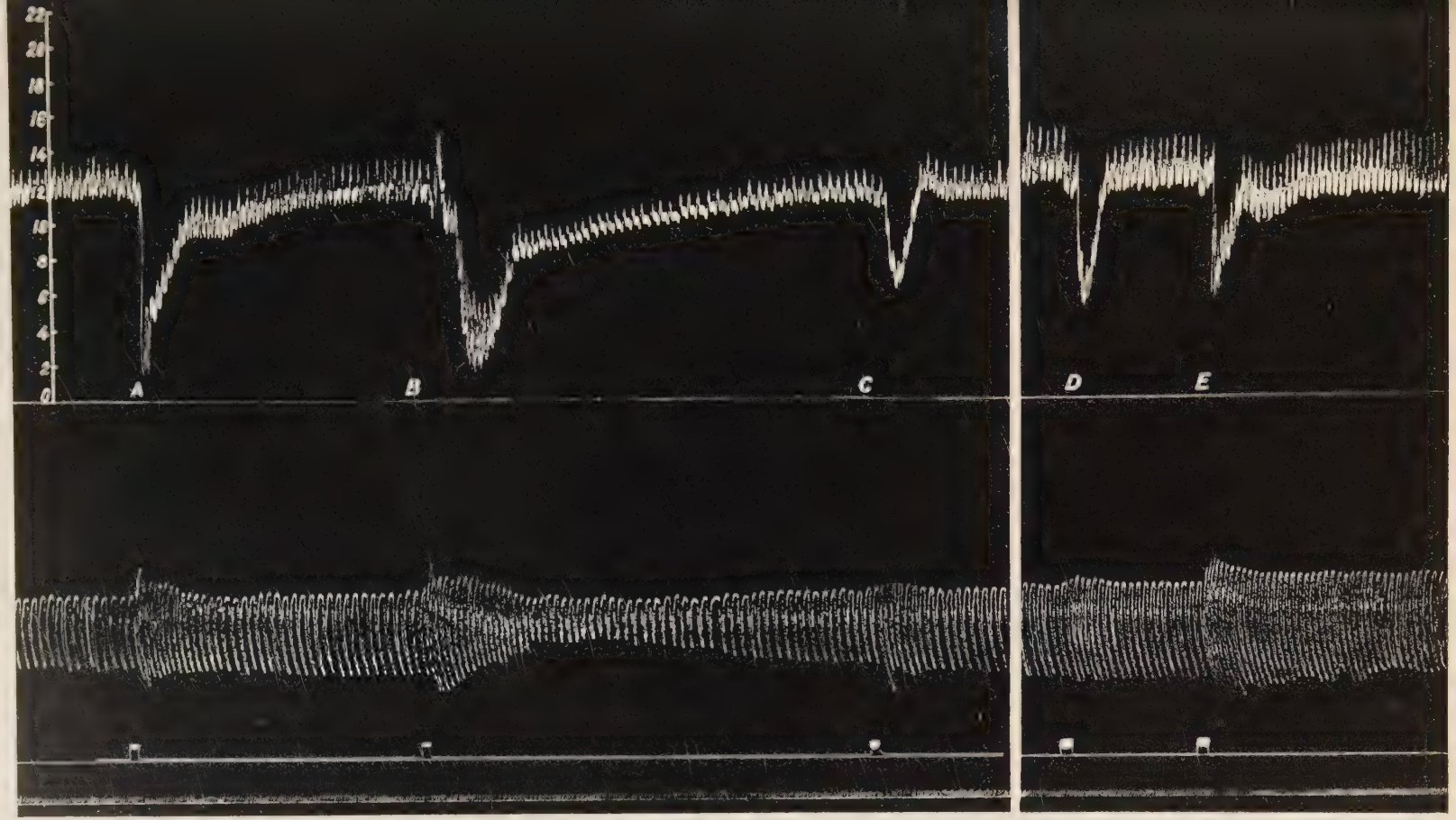
Il est donc difficile de vouloir schématiser à l'extrême en un terrain aussi délicat à explorer que celui des réactions du système nerveux végétatif, réagissant globalement par l'hypotension ou l'hypertension que nous montrent nos graphiques.



GRAPHIQUE I. — PHARMACODYNAMIE

CHIEN CHLORALOSÉ.

Buis extrait, injection correspondante à 0 gr. 225 plante sèche par kg.

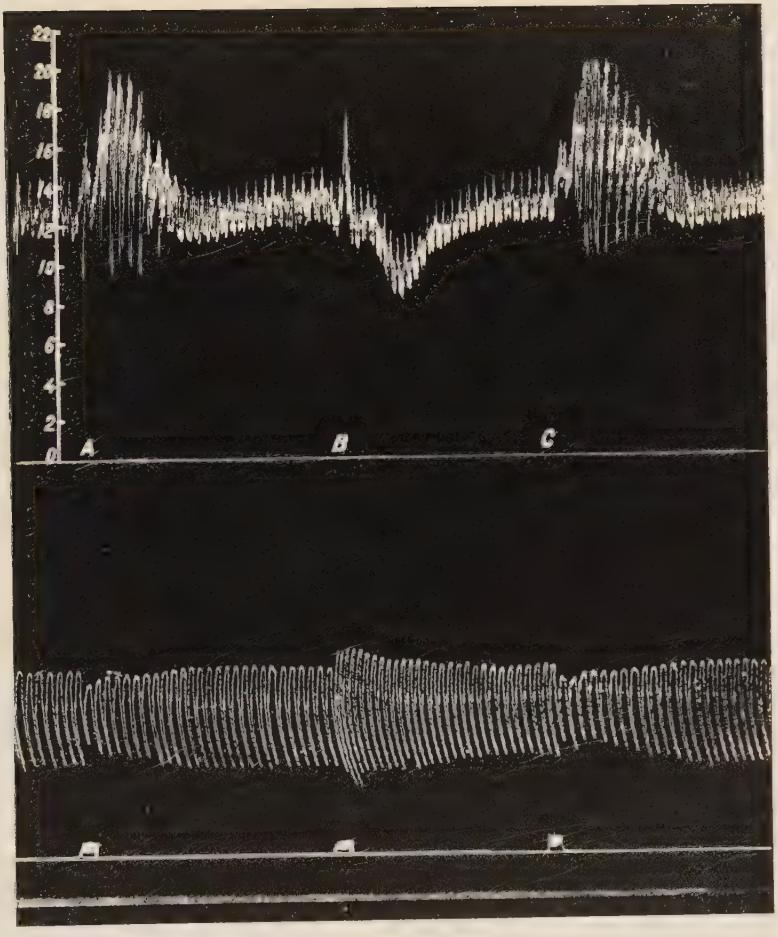


GRAPHIQUE II/1. PHARMACODYNAMIE GRAPHIQUE II/2

CHIEN CHLORALOSÉ.

A. Acétylcholine 0 mgr. 07 par kg.
B. Buis extrait correspondant à 0 gr. 045 plante/kg.
C. Acétylcholine 0 mgr. 07 par kg.

D. — Acétylcholine 0 mgr. 07 par kg.
E. — Buis extrait correspondant à 0 gr. 045 plante/kg. plus Acétylcholine 0 mgr. 07 par kg. Injectés en même temps.



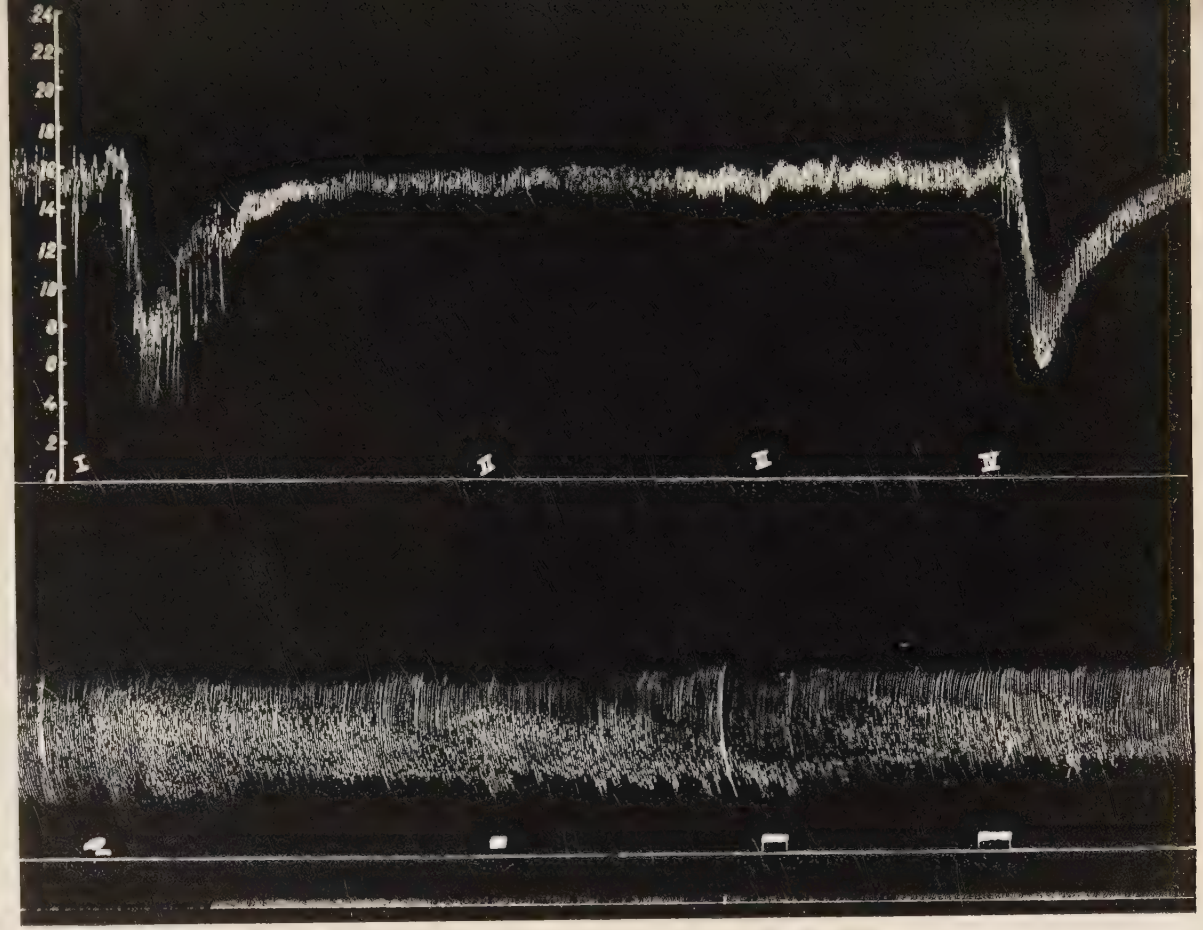
GRAPHIQUE III. — PHARMACODYNAMIE

CHIEN CHLORALOSÉ.

A. — Adrénaline 0 mgr. 005 par kg.

B. — Buis extrait correspondant à 0 gr. 045 plante/kg.

C. — Adrénaline 0 mgr. 005 par kg.



GRAPHIQUE IV. PHARMACODYNAMIE

CHIEN CHLORALOSÉ.

I. Buis extrait correspondant à 0 gr. 05 plante/kg.

II. — Alcaloïdes totaux 0 mgr. 25 par kg.

III. — Alcaloïdes totaux 1 mgr./kg.

IV. — Buis extrait correspondant à 0 gr. 20 plante/kg.

CHAPITRE III

UNE METHODE DE DETECTION BIOCHIMIQUE DU BUIS

Application à la falsification de la bière par addition de Buis

Il est classique de citer parmi les fraudes à rechercher dans la fabrication de la bière, l'addition de Buis destinée à en augmenter l'amertume surtout en période de pénurie de Houblon, les feuilles de Buis étant une matière première abondante et peu coûteuse. L'amertume de la bière est ainsi sauvegardée mais non point la santé des buveurs de bière puisqu'il a été signalé quelques cas d'intoxications, parfois même mortelles.

Cette addition de Buis, sous forme de certaines préparations : infusions, décoctions surtout, non dépourvues, comme nous venons de le voir, d'effet pharmacologique s'avère être d'une pratique non seulement frauduleuse, mais aussi dangereuse. Comment éventuellement dépister cette pratique ? A notre connaissance aucun procédé spécial n'a été préconisé dans ce but. L'extraction par voie chimique des alcaloïdes du Buis, particulièrement de la buxine peut être faite. Il nous a semblé intéressant d'apporter ici un exemple d'un procédé biochimique basé sur la mise en évidence de l'intense pouvoir inhibiteur du Buis vis-à-vis de la cholinestérase du sérum de cheval, pouvoir qu'il est facile de mettre en évidence dans la bière fraudée par addition de Buis.

A la suite des travaux de D. Vincent et Mlle Mathou (1945) [137] que nous avons nous-mêmes poursuivis ici, il est démontré que les décoctions de feuilles de Buis (*Buxus sempervirens* L, *Buxus balearica* Wild), sont des inhibiteurs extrêmement puissants de la cholinestérase du sérum de cheval. Il suffit d'ajouter dans le milieu où se fait le dosage un volume de décoction de Buis correspondant à 0 gr. 003 de plantes fraîches pour inhiber de plus de 50% l'activité cholinestérasique du sérum de cheval.

Ainsi, sous réserve de vérifications que la bière normale ne possède aucun effet inhibiteur propre, peut-on espérer déceler l'addition de Buis, même en très petites quantités, à la bière, par la seule constatation de cet effet.

Nous avons étudié trois échantillons de bières diverses fabriquées à Toulouse (Juin 1946) : Montplaisir, Strasbourg, Darribeau. L'addition de 1 cm ^{3} de bière dans le volume total de 50 cm ^{3}, où est titrée la cholinestérase de 1 cm ^{3} de sérum de cheval, ne provoque pratiquement aucune inhibition fermentaire par rapport à l'essai-témoin (1 cm ^{3} de sérum de cheval seul dans le volume total de 50 cm ^{3}) (Tableau X).

TABLEAU X

		Diverses bières essayées		
		Montplaisir	Strasbourg	Darribeau
Quantité de NaOH 0,01 N utilisée en 20 minutes (en cm ^{3})	Bières (1 cm ^{3} de bière dans l'essai) ..	5, 95	4, 65	6, 10
	Témoins (1 cm ^{3} de sérum de cheval dans l'essai)	6, 20	4, 90	6, 30

A l'aide donc de nos trois spécimens de bière, nous nous sommes proposé de fabriquer toute une série de dilutions

de la décoction de feuilles de Buis, à 10% dans la proportion de 1 à 10 %, c'est-à-dire 10 cm³ à 100 cm³ de décoction par litre de bière. L'addition de 1 cm³ de bière ainsi falsifiée dans le volume total de 50 cm³ où est titrée la cholinestérase de 1 cm³ de sérum de cheval occasionne une inhibition assez marquée, comme en témoigne le tableau ci-dessous.

TABLEAU XI

Valeur de l'intensité de l'action anticholinestérasique d'une bière falsifiée par addition de Buis

		Pourcentage d'inhibition observé				
Valeur de l'inhibition cholinestérasique observée (1 cm³ de bière falsifiée dans l'essai) Volume total : 50 cm³.	Bière Montplaisir	67,1	56	42	35	24
	Bière Strasbourg	68	56	44	37	24
	Bière Darribeau	76	63	52	45	34
Pourcentage de la décoction de feuilles de Buis à 10 % dans la bière		10%	5%	3%	2%	1%
Poids correspondant en Buis (plante fraîche dans l'essai) (en mgr.) Volume total : 50 cm³.		10	5	3	2	1

Chaque fois donc qu'une inhibition dépasse 15 à 20 % on peut conclure, sous toutes réserves ultérieures sur des bières étrangères que nous n'avons eu la possibilité d'essayer, à une falsification de la bière. Nous avons toutefois vérifié qu'une infusion de houblon à 5% n'a, à la dose de 1 cm³ dans l'essai, aucun effet inhibiteur sur la cholinestérase du sérum.

Cette méthode est-elle absolument spécifique ? Notons, entre autres, une cause d'erreur qui peut résider dans l'addition frauduleuse, elle aussi, de strychnine à la bière. Or, cet alcaloïde est un inhibiteur relativement actif de la sérum-cholinestérase. D'après les résultats de D. Vincent et P. Beaujard [132] et si l'on se place dans les mêmes conditions de la détermination ci-dessus, il nous faut ajouter 0 gr. 050 de strychnine par litre de bière pour obtenir une

inhibition de l'ordre de 20%. Une telle dose est évidemment inutilisable dans ce but à cause de sa trop grande toxicité.

Il est classique aussi de citer la falsification de la bière par addition de picrotoxine. Nous avons recherché si cette substance avait un effet d'inhibition sur la cholinestérase, à la dose de 5 milligrammes et de 1 milligramme dans l'essai nous n'avons observé aucune inhibition notable.

Ceci tend donc à apporter au procédé biochimique que nous préconisons une spécificité intéressante.

CONCLUSIONS

Nous avons apporté dans ce travail le résultat de nos investigations personnelles concernant l'effet inhibiteur du Buis sur la cholinestérase du sérum, ferment hydrolysant l'acétylcholine.

Pour situer ces recherches nous avons préalablement donné un aperçu de nos connaissances sur le Buis au point de vue botanique comme au point de vue chimique et pharmacologique. Nous nous sommes aussi arrêté à l'étude générale de la cholinestérase du sérum, à la biochimie de cet enzyme, à ses inhibiteurs et ses activateurs, à son rôle et son importance clinique.

Nos recherches personnelles nous ont conduit aux résultats suivants :

I. — Nous avons confirmé l'action inhibitrice extrêmement puissante que possède le Buis sur l'hydrolyse enzymatique de l'acétylcholine par la cholinestérase du sérum de cheval et du sérum humain. Si l'on s'en rapporte à la décoction de feuilles de *Buxus sempervirens* L., on voit qu'à la concentration de 1/50.000 de Buis dans l'essai, l'inhibition de la cholinestérase est voisine de 50%.

II. — Parmi les diverses parties de la plante, les feuilles se révèlent les plus actives ; l'écorce l'est légèrement moins ; les fruits mûrs n'ont qu'un pouvoir inhibiteur bien plus modeste, tandis que le bois en est pratiquement dépourvu.

III. —Nos investigations ont porté sur trois espèces de Buis :

Buxus sempervirens L.

Buxus balearica Wild.

Buxus longifolia Boissier.

dont nous avons comparé l'action des feuilles.

Buxus balearica Wild. présente le plus fort pouvoir inhibiteur.

Buxus sempervirens L. est considérablement moins actif.

Buxus longifolia Bois, se classe entre les deux.

Néanmoins, ces trois espèces sont actives.

A côté des *Buxus*, nous avons étudié *Sarcococca pruniformis* Lind autre Buxacée apparentée au Buis. Nous y avons trouvé une action anticholinestérasique modérée, assez nette mais beaucoup moins intense que dans le genre *Buxus*.

IV. — Comparant les effets inhibiteurs de diverses préparations de *Buxus sempervirens* L. (décoction, infusion, teinture, extrait, et bloc alcaloïdique total) nous avons montré que toutes ces préparations sont douées d'une très forte activité. Toutefois, les feuilles fraîches donnent des préparations notablement plus actives que les feuilles desséchées à 100° ; la teinture paraît un peu plus active que la décoction ou l'extrait.

Les alcaloïdes sont bien les principes inhibiteurs anticholinestérasiques du Buis. Leur activité, après séparation « en bloc », est du même ordre de grandeur que celle de la plante. Cependant une perte d'activité considérable est décelée, surtout par rapport à la plante fraîche.

Indiquons enfin qu'un échantillon ancien de sulfate de buxine de collection s'est révélé beaucoup moins actif que les alcaloïdes totaux que nous avions extraits nous-même de la plante.

Les alcaloïdes totaux à la concentration de 10^{-6} donnent encore une inhibition de la cholinestérase sérique qui atteint 70%. Ils peuvent donc se classer parmi les alcaloïdes les plus puissamment inhibiteurs de la cholinestérase.

V. — Comme application pratique de l'intense inhibition cholinestérasique provoquée par le Buis, une méthode est indiquée permettant la détection de l'addition frauduleuse de cette plante dans la bière. Nous avons montré que toute bière dont 1 cm^3 ajouté à l'essai de titration de la cholinestérase de 1 cm^3 de sérum de cheval provoque une inhibition de 20% peut être considérée comme contenant du Buis.

VI. — A ces recherches faites *in vitro* ont fait suite des recherches sur l'animal. Nous retiendrons ici seulement très brièvement les résultats de l'expérimentation pharmacodynamique sommaire faite sur le chien.

L'injection d'extrait de Buis dans la saphène provoque une baisse de la pression artérielle et des modifications du rythme et de l'amplitude respiratoire.

Contrairement à ce qu'on pourrait attendre d'après l'effet anticholinestérasique constaté *in vitro*, nous n'avons pas pu mettre en évidence l'action potentialisatrice de l'acétylcholine par le Buis dont l'injection préalable n'a pas augmenté l'hypotension acétylcholinique. De même, l'effet hypertenseur de l'adrénaline n'est pas modifié. Enfin les alcaloïdes se sont montrés sur l'animal beaucoup moins actifs que l'extrait correspondant.

Il est difficile de préciser dans quelle mesure l'action inhibitrice du Buis sur la cholinestérase est responsable de l'action pharmacologique du Buis. Il semblerait logique cependant de lui imputer l'effet d'hypotension et aussi les symptômes de crises convulsives décrites par les auteurs, notamment S. Ringer et W. Mürrel, chez la grenouille

par le Buis, et qui pourraient être expliquées par la persistance anormale de l'acétylcholine médiateur chimique de l'influx nerveux au niveau des plaques motrices ou des relais sympathiques. Cependant le fait que nous n'avons étudié que la cholinestérase du sérum, non celle du système nerveux, ne nous permet d'envisager cette manière de voir que comme une hypothèse.

QUESTIONS POSÉES PAR LA FACULTÉ

1° Toxicologie du Benzène et du Benzol.

2° Vitamine K.

3° Symbiose et Tubérification.

Vu :
Le Président de la Thèse,
D. VINCENT.

Vu :
Le Doyen,
J. CALVET.

Vu et permis d'imprimer :
Toulouse, le 6 juin 1947.

Le Recteur,
Président du Conseil de l'Université,
DOTTIN.

BIBLIOGRAPHIE

[1] Abdon (N-O) and Uvnas (B). — *Scand. Arch. Physiol.*, 1937.1.76.

[2] Alles (G.) and Hawes (R.). — *Journ. Biol. Chem.*, 1940.133.375.

[3] Alessandri (Dr. P.E.). — *Sui principii attivi del Buxus Sempervirens* L «*La gazetta chimica italiana* », Anno XII vol. XII, 1882, pp. 98-108.

[4] Ammon (R.). — 1. *Die cholinesterase* — « *Ergebnisse der Enzymforschung* », 1935.4.102.

— 2. *Die Hemmungkörper der cholinesterase*, « *Erg. Enzymforschung* », 1943.9.35.

[5] Ammon (R.) und Woss (G.). — *Die Acetylcholinzerstörende Wirkung des Blütes Pflügers*, « *Arch. für Physiol* », 1935.235.293.400.

[6] Antopol, Tuchmann et Shifrin. — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1937.46.36.

[7] Aron et Herschberg (A.-D.). — *Le dosage de la cholinesterase en clinique* « *Presse Médicale* », 1946.107.

8] Bacq (Z.-M.) and Brown (G.-L.). — *Pharmacological experiments on mammalian voluntary muscle en relation to the theory of chemical transmission*, « *Journ. of. Physiol* », 1935, 84.259.

[9] Baillon (H.). — 1. *Sur la véritable organisation du Buis*, « *Bull. Soc. Bot. Fr.* », 1856, p. 285.

— 2. *Monographie des Buxacées et des Stylocérées*, Paris, 1859, 87 p., 3 pl.

— 3. *Traité de Botanique médicale*, Paris, 1884, pp. 980-981.

— 4. *Histoire des Plantes*, Paris, 1865, 95, t. VI, p. 28.

[10] Barbaglia (G.-A.). — 1. *Sugli alcaloïde del Buxus sempervirens*, « *La gazetta chimica italiana* », Anno XIII, vol. XVII, 1883, pp.249-257.

— 2. *Uber in viertes alcaloïd* (*Parabuxinidin*) *der Buxbaum Buxus Sempervirens L.* « *Ber. d. durch chem. Gesselschaft* », 1884, II, pp. 2655-2656.

— 3. *Il giunto alcaloïde del Buxus sempervirens L. é la Bussinamina*, Atti della societa toscana di Scienzi naturali, « *Mémoire* », vol. V, Pisa 1885-87, pp. 29-30.

— 4. *Sulla parabussinida, alcaloïde del Buxus Sempervirens.* — *Ibid.* Vol. VII, 1885-87, pp. 149-153.

— 5. *Contribuzione alla studio del Buxus sempervirens L. pianta della famiglia della Euphorbiaca.* — *Ibid Vol.* VIII. 1887, pp. 255-270.

[11] Bazoche (G.). — *Etude sur l'emploi du Buis en médecine surtout comme fébrifuge.* Thèse Médecine, Strasbourg, 1869.

[12] Beaujard (P.). — *Recherches sur les alcaloïdes inhibiteurs de la cholinestérase.* Thèse Pharmacie. Toulouse, 1944.

[13] Beille (Dr.). — *Précis de botanique pharmaceutique*, t. II, Ier partie, 2e éd. revue et corrigée. Paris, 1935.

[14] Bentham (G.) et Hooker. — *Euphorbiacae, in Genera plantarum* III. p. 265, 1883.

[15] Bernheim (F. and. M.). — *Action of drugs ou the cholinesterase of the brain*, « *Journ. of. Pharm.* » , 1936, 57.427.

[16] Bley (Dr.). — « *Tromsdorffs Neues Journal der Pharmacie* » XXV. Stücke 2, s. 54 und. s. 10.

[17] Bonnier (G.). — *Flore complète de France, de Suisse et de Belgique*, 1928, 10.21.

[18] Brygoo (P.). — *Le pouvoir cholinestérasique du sérum dans la syphilis et ses rapports avec la thérapeutique arsénicale*, Thèse Médecine Toulouse 1945.

[19] Caujolle (F.), Vincent (D.) et Franck (C.). — *Action anticholinesterasique des essences végétales.* Com. Soc. Pharm. Toulouse, février 1944.

[20] Cazin (F.-J.). — *Traité pratique et raisonné des plantes médicales indigènes et acclimatées*, 5e éd. rev. et corr. par Dr. H. Cazin, 1886, p. 224.

[21] Chang (H.C.) and Gaddum (J.H.). — *Cholines esters in tissues extracts.* « *Journ. Of. Physiol.* », 1933.79.255.

[22] *Codex medicamentus gallicus seu Pharmacopœa Gallica.* Ed. 1908, 1920, 1937.

[23] Collier (H.) and Allen (D.). — *Enzymin inhibition by dérivative of phenothiazin*, « *Canad. Journ. Res. B.* », 1942.20.189.

[24] Cornevin (Ch.). — *Des plantes vénéneuses et des empoisonnements qu'elles déterminent*, 1887, pp. 175-178.

[25] Cristol (P.), Passouant (P.), Benezech (E.) et Dutartre (Mlle). — *Valeur séméiologique de la cholinestérase sérique*, « *Presse Médicale* », 1947, 557.

[26] Dale (H.H.). — *The action of certains esters et ethers of cholin and their relation to muscarine*, « *Journ. of pharm.* », 1914.6.147.

[27] Dale (H.-H.) and Feldbeeg (W.). — *Chemical transmission at motor nerve endings in voluntary muscle*, « *Journ. of Physiol.* », 1934.81.39.

[28] Danielopoulu (D.). — *Sur le rôle de l'acétylcholine dans la production du choc paraphylactique (anaphylactique)*, « *Presse Médicale* », 1946.715.

[29] Dastugue (G.), Bresson (A.) et Ghandour (M.). — *Recherches sur le mécanisme de l'action sensibilisante de la dihydroxycodéinone vis-à-vis de l'acétylcholine*, « *Bull. de Pharm.* », 1940.47.144.

[30] Easson (L.H.) and Stedman (E.). — *Cholinestérase. An enzyme présent in the blood sérum of the horse*, « *Bioch. Journ.* », 1932.26.2056.

[31] Engelhart (E.) und Lœwi (O.). — *Permantive Azetylcholinspaltung im Blut und ihre Hemmung durch Physostignin.* « *Arch. f. exp. Path. und Pharm.* 1930.150.1.

[32] Faber Mogens.— *Choline esterase in diseases.* « *Acta médica scandinavica* » 1943.114.59-60.

[33] Fauré. — *Examen chimique de l'Ecorce de Buis, Buxus sempervirens L.* «*Journ. de Pharm.* », XVI, 1830, p. 428.

[34] Feldberg (W.), Minz (B.) and Tzudzimma (H.). — *The mechanism of the nervous discharge of adrenaline,* « *Journ. of Physiol.* », 1934.81.286.

[35] Fiessinger (N.), Glomaud (C.) et Carlotti (J.). — *La cholinestérase dans les affections hépatiques,* « *Bull. Acad. Médecine* », 1944.128.293.

[36] Fiessinger (N.) et Glomaud (C.). — *La cholinestérase sérique en pathologie hépatique,* « *Revue du foie* », 1945.4.129.

[37] Flückiger (F.A.). — *Zur Geschichte des Buxus. Neues Jahrbuch für Pharmacie XXXI,* 1869, p. 257, « *Pharm. Journ.* », XI, 1870, p. 192.

[38] Freitas (Dr C. de). — *Observations sur le Buis (Buxus sempervirens). Critique expérimentale du travail de Ringer et Mürrel.* « *Arch. de Physiol.* » 2e S, V, 1878, pp. 493-506.

[39] Froment (J.) et Kaswin (A.). — *Augmentation de l'activité cholinestérasique du sérum au cours des polynévrites chez l'homme, et le rôle de la vitamine* B_1. « *Bull. Soc. Méd. Hôp. de Paris* », 1945.61.57.

[40] Frommel (E.), Herschberg (A.) et Piquet (J.). — 1. *Effets des ions minéraux sur l'activité de la cholinestérase sérique.* — I. *Etudes* in vitro *sur le sérum de cheval.* « *Helvetia Physiol. Acta* », 1944.2.169.

— 2. II. *Etudes* in vivo *sur le cobaye.* « *Helvetia Physiol. Acta* », 1944.2.193.

[41] Frommel (E.) et Piquet (J.). — 1. *La part du déséquilibre cholinergique dans le syndrome du choc opératoire et du choc traumatique* ». « *Schweitz. Méd. Woch* », 1946.76.432.

— 2. *L'inhibition de la cholinestérase au cours du choc est-elle réellement une des causes du choc* ?. « *Schweitz. Med. Woch* », 1946.76.456.

[42] Fuchsius (Leonhartus). — *De historia stirpium commentarii insignus.* « *Basilae* », 1542. — *Ed. Lugdun,* in-8°, 1849, p. 613.

[43] Führer (H.). — *Untersuchungen über den synergismus von Giften. Die chemische. Erregbar keiteigerung glatter Muskulatur.* « *Arch. f. exp. Path.* » 1918.82.51.

[44] Gautrelet (J.) et Corteggiani (E.). — *Le sort de l'adrénaline et de l'acétylcholine dans l'organisme.* « *La médecine* », 1935.726.

[45] Gautrelet (J.) et Scheiner (H.). — *Détermination du pouvoir anticholinestérasique de différentes substances par la méthode de la décontraction du muscle droit de l'abdomen de la grenouille contracté par l'acétylcholine.* « *Cr. Soc. Biol.* », 1939.131.738.

[46] Glick (D.). — *Properties of cholinesterase in human sérum.* « *Bioch. Journ.* », 1937.31.521.

[47] Gubler (P.). — *Commentaires thérapeutiques du Codex médicamentarius*, 1874, p. 40.

[48] Gunther (J.). — *Absence of pseudocholinesterase from tissues of ruminant.* Nature (Brit.) 1946.157.395.

[49] Hallier (H.). — *Uber der Umfang die Gliederung und die Verwandschaft der Famillie Hamamelidaceae.* « *Beih. Bot. Centralbl.* », XIV, 1903. 247-260.

[50] Hall (G.-E.) and Lucas (C.C.). — *The acétylcholine-cholinesterase system.* « *Journ. Pharm. exp. Ther.* » 1937.61.10.

[51] Halpern (N.) et Corteggiani (E.). — *Etude comparative de la destruction de l'acétylcholine par divers organes de cobaye, de grenouille et d'escargot.* « *C.R. Soc. Biol.* », 1935.119.1049.

[52] Hanway (J.). — *An account of the butish trade over the Caspian Sea* Vol. I, p. 191.

[53] Harris (M. and R.R.). — *Effet « in vitro » of curare and erythroïdin hydrochloride on cholinesterase of human blood serum.* — « *Proc. soc. exp. Biol. a. Med. Am.* » 46.1941.619.623.

[54] Hegi (G.). — *Illustrieste Flora von Mittel. Europa. Buxaceae. V. Band.* I teil. s. s. 202.213 — München.

[55] Herail (J.). — *Traité de matière médicale. Pharmacographie*, 1912, pp. 559 et 590. Paris.

[56] Hermann (H.). — *La théorie de la transmission humorale de l'excitation nerveuse. Examen de sa validité sur la glande médullo-surrénale.* « *La Médecine* », 1938.19.705.

[57] Herschberg (A.-D.). — *Contribution à l'étude de la régularisation physiologique du système acétylcholine-cholinestérase.* Thèse Sciences, Paris, 1946.

[58] Herschberg (A.-D.) et Epstein. — *Etude sur la cholinestérase.* — IX. *Taux de la cholinestérase sérique et réactivité à la thérapeutique chez les asthmatiques.* « *Arch. Sc. Phys. Nat.* » 1944.26.129.

[59] Hicks (C.) and Mc. Kay. — « *Austr. Journ. exp. Biol.a. Med.* », 1936. 14.275 ; 1938.16.39.

[60] Hildegarde (Sainte). — *Physica, de Arboribus.*, Cap. XXII. Ratisbonne, 1533.

[61] Hutchinson (J.). — *Buxaceae in the families of flowering plants.* I. *Dicotyledons*, p. 216, London, 1926.

[62] Jones (M.) and Stadie (W.).— « *Quart. Journ. exp. Physiol.* », 1939.29.63.

[63] Jussieu (A. de). — 1. *De Euphorbiacearum generibus medecinisque earundem viribus Tentamen*, p. 118. tab. 18. Paris, in-4°, 1824.

— 2. *Considérations sur la famille des Euphorbiacées*, « *Mémoire du Muséum d'Histoire Naturelle* », X.

[64] Kahane (E.). — *Recherches sur la biochimie de la choline et de ses dérivés. L'acétylcholine du sang.* « *Bull. Soc. Chim. Biol.* », 1936.18.479.

[65] KAHANE (E.) et LÉVY (J.). —1. *Caractérisation et dosage de l'acétylcholine dans les subsances biologiques.* « *Bull. Soc. Chim. Biol* », 1936.18. 505.

— 2. *Action du sang sur quelques ammoniums quaternaires à fonction ester.* « *Bull. Soc. Chim. Biol.* » 1936.18.529.

— 3. *Inhibtion de l'hydrolyse de l'acétylcholine par le sérum.* « *C.R. Soc. Biol.* » 1936.121.1596.

— 4. *Sur la présence à l'état dissimulé d'une substance acétylcholinique dans le sang normal.* « *Bull. Soc. Chim. ,Biol.* » 1937.19.777.

— 5. *Apparition de la choline dans les substances biologiques. La choline du sperme.* « *Bull. Soc. Chim. Biol.* », 1937.19.959.

— 6. *Recherche sur la biochimie de la choline et de ses dérivés. Action des muscles de sangsues et de grenouille sur quelques ammoniums quaternaires à fonction ester.* « *Bull. Soc. Chim. Biol.* », 1937.19.976.

— 7. *Influences de quelques agents antiestérasiques sur l'activité pharmacodynamique de l'acétylcholine.* « *C.R. Soc. Biol.* », 1937.125.252.

[66] KAHN et SURLES. — « *Arch. Internat. Pharm.* », 1938.58.88.

[67] KASWIN (A.). — *La cholinestérase du sérum humain à l'état physiologique et dans divers états pathologiques.* « *Presse Médicale*», 1945.713.

[68] KEESER. — « *Klin. Woch* », 1937.17.1811.

[69] KOCHTOJANZ (Ch.-S.). — *De la cholinestérase chez les invertébrés.* « *Ukrainian Bioch. Journ.* », 1936.9.665.

[70] LABORIT (H.) et MORAND (P.). — *L'activité cholinestérasique et son rôle probable dans le mal de mer.* « *Revue Méd. Navale* », 1946.1.24.

[71] LEBEAU (P.) et COURTOIS (G.). — *Traité de pharmacie chimique*, t. II, fasc. 2, p. 1694. Paris, 1938.

[72] LECLERC (Dr. H.). —1. *Histoire du Buis.*, « *Courrier Médical* », 22 juin 6 juillet 1919 ; « *Janus* », 1922.

— 2. *Précis de phytothérapie*, 3e éd., 1935, pp. 76-77.

[73] LEWIN. — *Traité de toxicologie*, traduit par G. Pouchet, 1903, p. 835.

[74] LIEBRECHT (L.). — *Cholinestérase et tension artérielle*, « *Presse Médicale* », 1947.163.

[75] LINNÉ. — 1. *Spécies plantarum.* Stockholm, 1753.2.983.

— 2. *Materia. Medica*, 1782, p. 229 4e éd. par MM. Ch. D. Schreber. Leipzig et Erlangen.

— 3. *Systema vegetabilium*, traduit par M.J.P. Mouton-Fontenille, 1804.4.99.

[76] LOEWI (O.). — *Über humorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung.* « *Arch. f. Physiol.* », 1921.189.239 et 1922.193.201.

[77] LOEWI (O.) und NAVRATIL (E.). — *Über den Mechanismus der Vaguswirkung von Physostignin und Ergotamin.* « *Arch. f. Physiol.* », 1926.214. 689.

[78] MAC ARDLE (B.). — « *Quart. Journ. Méd.* » 1940.9.107.

[79] Mac George (H.-H.). — « *Lancet* », 1937.1.69.

[80] Malbec (L.). — *La cholinestérase du sérum, dans la tuberculose pulmonaire*, Thése Médecine, Toulouse, 1947.

[81] Marchadier (A.-L.) et Goujon (A.). — *Notions pratiques de toxicologie végétale indigène*, 1926.29.

[82] Marnay (A.). — 1. *Action de l'acétylcholine sur le muscle isolé* « *C.R. Soc. Biol.* » 1937.125.1007.

— 2. *Action de l'acétylcholine sur le muscle haché.* « *C.R. Soc. Biol.* » 1937.125. 1009.

— 3. *Cholinestérase dans le muscle strié de crapaud.* « *C.R. Soc. Biol.* », 1938. 128.290.

— 4. *Cholinestérase dans le pancréas et la rate de quelques mammifères.* « *C.R. Soc. Biol.* », 1938.128.519.

[83] Marnay (A.) et Nachmansohn (D.). — *Cholinestérase in voluntary frog's muscle*, « *Journ. of physiol.* », 1937.89.359.

[84] Martin-Sans (E.). — *Généralités de la présence d'alcaloïdes chez les Buxacées.* « *C.R..Acad. Sciences* », 1930.191.625.626.

[85] Martin-Sans (E.) et Pouchet (J.-Ch.). — *Sur l'appareil sécréteur des Buxus.* « *Bull. Soc. Hist. Natur.* », Toulouse, 1930.60.231-232.

[86] Massart (L.) et Dufait (R.). — *Activations et inhibitions de la cholinestérase*, « *Bull. Soc. Chim. Biol.* », 1939.21.1039.

[87] Mathou (Mlle Th.). — 1. *Notes sur le Buxus longifolia Boissier.* Extrait du 66e Congrés des Sociétés Savantes, 1933.

— 2. *Recherches sur la famille des Buxacées.* Thèse Sciences, Toulouse, 1940.

[88] Matthes (K.). — *The action of blood on Acetylcholine.* « *Journ. Physiol.* », 1930.70.338.

[89] Maugein (Mlle A.). — *Dosage biochimique de l'ésérine*, Thèse Pharmacie, Toulouse, 1943.

[90] Mazur (A.) and Bodansky (O.). — *The mechanism of* in vitro *and* in vivo *inhibition of cholinesterase activity by di-isopropyl-fluorophosphate.* « *Journ. Biol. Chem.* », 1946.168.261.

[91] Mendel (B.), Mundell (D.B.) and Strelitz. — *Nature* (*Brit.*), 1939. 144.479 ; 1940.145.822.

[92] Mendel (B.) and Rudney. — *Studies on cholinesterase.* I. *Cholinesterase and pseudo-cholinesterase.* « *Biochim. Journ.* » 1943.37.59.

[93] Mendel (B.) and Mundell (D.-B.). — *Studies on cholinesterase II.* — *A method for purification of pseudo cholinesterase from dog pancréas.* « *Biochim. Journ.* » 1943.37.64.

[94] Mendel (E.), Mundell (D.-B.) and Rudney. — *Studies on cholinesterase III.* — *Specific tests for true cholinesterase and pseudo-cholinesterase.* « *Nature* (*Brit*), 1943.37.473.

[95] Minz (B.). — *Pharmakologische. Untersuchungen an Blutegel präparat. Zügleich eine Méthod zum biologischen Nachweis von Acetylcholin bei amwesenheit anderer Pharmakologische wirksamer Körpereigener Stoffe.* « *Arch. f. exp. Path.* » 1932.168.292.

[96] Müller (C.). — *Buxaceae, in* De Candolle : *Prodomus systemalis naturalis regni vegetabilis* XVI, s. 1, p. 7. Paris, 1869.

[97] Nachmansohn (D.). — 1. *La transmission de l'influx nerveux dans le système nerveux central.* « *C.R. Soc. Biol.* », 1937.126.783.

— 2. *Cholinesterase dans les tissus embryonnaires.* « *C.R. Soc. Biol.* » 1938.127.670.

— 3. *Cholinestérase dans le tissus nerveux.* « *C.R. Soc. Biol.* » 1938.127.894.

— 4. *Distribution de la cholinestérase dans le cerveau humain.* « *C.R. Soc. Biol.* » 1938.128.24.

— 5. *Cholinestérase dans les fibres nerveuses.* « *C.R. Soc. Biol.* » 1938.128.516.

— 6. *Changement de la cholinestérase dans le muscle strié.* « *C.R. Soc. Biol.* », 1938.128.599.

— 7. *Cholinestérase dans le système nerveux central.* 16e Congrés internat. Physiol. 1938. Zurich.

— 8. *Sur l'inhibition de la cholinestérase.* « *C.R. Soc. Biol.* », 1939.130.1065.

[98] Nachmansohn (D.) et Marnay. — 1. *Action des substances sympathomimétiques et para-sympathomimétiques sur les processus chimiques fournissant l'énergie de la contracture musculaire.* II. *Action de l'acétylcholine.* « *Bull. Soc. Chim.* », 1937.19.445.

— 2. *Cholinestérase dans le muscle strié du chat.* « *C.R. Soc. Biol.* », 1937.124.446.

— 3. *Cholinestérase dans le muscle strié.* « *C.R. Soc. Biol.* », 1937.124.946.

— 4. *Cholinestérase dans le nerf de Homard,* « *C.R. Soc. Biol.* », 1937.125.1005.

— 5. *Cholinestérase dans le muscle strié après dégénérescence du nerf moteur.* « *C.R. Soc. Biol.* », 1937.126.785.

— 6. « *Bull. Soc. Chim. Biol.* », 1939.6.7.

[99] Nachmansohn (D.) et Lederer (E.). — *Sur la biochimie de la cholinestérase. Préparation de l'Enzyme. Rôle des groupements (SH).* « *Bull. Soc. Chim. Biol.* », 1939.21.797 et suiv.

[100] Neydeck (M.). — *Der Buchs, das zuverlässigste und billigste. Heil mittel der Wechselfieber.* 1859.

[101] Paget (M.) et Dhellemmes (G.). — *De la pseudo cholinesterase du sérum humain et de sa sensibilité à l'action de la vitamine H' et des antivitamines H'.* « *C. Acad. Sciences* », 24 février 1947.

[102] Passouant (P.). — *La maladie de Steinert et le problème de la transmission neuro-musculaire.* Thèse Médecine. Montpellier, 1943.

[103] Pavia. — *Bussina e Parabussina alcaloïdi del Buxus sempervirens.* « *Bolletino pharmaceutico* », 1868.8.60 ; 1871.10.114.

[104] Pax (F.). — *Buxaceae.* « *Die Pflanzenareale* », 1927.1.7, carte 70.

[105] Payr. — « *Münsch. Med. Woch.* », 1940.7.

[106] Perrot (Em.). — *Matières premières usuelles du règne végétal,* t. II, p. 1297, Paris. 1943-44.

]107] Pichler (E.). — « *Arch. of. Psych.* », 1938-40.

[108] Planchon (G.) et Collin (E.). — *Les drogues simples d'origine végétale* 1895.1.343-345.

[109] Plattner (F.), Galehr (O.) und Kodera. — *Über das Schicksal des Acetylcholins im Blute.* « Pflüg. *Arch. Ges. Phys.* », 1928.219.678.

[110] Pouchet (J. Ch.). — *Recherche et localisation des alcaloïdes dans le genre Buxus Linné,* Thèse Pharmacie. Toulouse, 1930.

[111] Prat (Mlle J. de). — *La cholinestérase du sérum. Application clinique.* Thèse Pharmacie, Toulouse, 1945.

[112] Quastel (J.-H.), Tennenbaun (H.) and Wheatley (A.H.M.). — *Choline ester formation in and cholinesterase activity of tissus in vitro.* « *Bioch. Journ.* », 1936.30.1668.

[113] Richter (D.) and Croft (P.). — *Blood. - esterases.* « *Biochem. Journ.* », 1942.36.746.

[114] Riechert et Schmidt. — « *Naunyn Schmiedebergs. Arch.* » 1942.199.66.

[115] Ringer (S.) and Murrel (W.). — *Observations on Box, with special reference to the true nature of tetanos Medico chirurgical. Transactions.* LIX. 1876.

[116] Santenoise. — *Biochimie de la Vagotonine.* « *Exp. Ann. Biol. Med.* » 1942.

[117] Schaller (K.). — « *Z. Klim. Méd.* » 1942, n° 2, 565-89.

[118] Scheiner (H.). — *Recherches sur la contraction musculaire. Sensibilisation du muscle à l'acétylcholine et inhibition de la cholinestérase. Action de l'iodométhylate de β-naphtylquinoléine et de l'ésérine.* « *C.R. Soc. Biol.* 1946.140.34.

[119] Scholtz (M.). — *Bebeerin und Buxin.* « *Arch. Pharm.* », 1898.236.530. 541.

[120] Schweitzer (A.) and Wright (S.). — *The action of eserine and releted compounds of acetylcholine on the central nervous system.* « *Journ. of. physiol.* » 1937.89.165.

[121] Scoz et Cattanéo (C.). — *Déterminazion del potere colin esterasio del sangue per vie électrometrica.* « *Enzymologia* », 1937.4.157.

[122] Séro (Mlle I.). — *Une Apocynacée d'Afrique Equatoriale Tabernanthe Iboga.* Thèse Pharmacie, Toulouse 1944.

[123] Sobotka et Antopol. — *Enzymologia,* 1937.4.189.

[124] Solereder (H.). — *Systematic anatomy of the Dicotyledons.* Oxford 1908. *Buxaceae,* t. II, pp. 761-763 et 1053-1055.

[125] Stedman (E.) and Russel. — *The choline-esterase content of blood in myasthenia gravis.* « *Bioch. Journ.* », 1937.31.1987.

[126] Stedman (E.) and White (A.). — *A comparaison of the cholinesterase activitie of the blood sera from various species.* « *Biochem. Journ.* », 1933. 27.1055.1060.

[127] Ternetz (Mlle Ch.). — *Anatomie von Buxus in Christ. Uber das Workommer des Buchsbaums. Naturforscheude Gesselschaft in Basel Verhandlungen,* 1913.24.46.

[128] Tieghem (Ph. Van). — 1. *Méristèles corticales.* « *Ann. Sc. Nat. Bot.* », 8e S. 1897.5.159-160.

— 2. *Sur les buxacées.* « *Ann. Sc. Nat. Not.* », 8e S. 1897.5.289-338.

[129] Tournefort (J. de Pitton). — *Institutiones rei herbariae.* I, pp. 578-579. tab. 345.

[130] Vevey (Artault de). — 1. *La teinture de Buis contre les fièvres intermittentes hépatiques.* « *Reve de thérapeutique médicochirurgicale* », 1908, pp. 81-86 et 109-123.

— 2. *L'alcoolature de Buis contre les fièvres intermittentes hépatiques.* « *Bulletin de la Société de thérapeutique* », 4e S. 1915.20.56-61.

[131] Vincent (D.). — 1. *L'acétylcholine et son rôle dans l'organisme animal.* Thèse Doctorat es Sciences, Lyon, 1938.

— 2. *Dosage de l'acétylcholine et de la choline dans les tissus du cobaye après injection de fortes doses de chlorure d'acétylcholine.* « *Soc. Biol.* Lyon, 24 octobre 1938.

— 3. *Foie et enzymes du sérum* (Phosphatases, Cholinesterase, Arginase).

— 4. *La cholinestérase du sérum en pathologie.* « *Ann. Biol. Chimique* », 1946. 4.101.

— 5. *Cholinestérase et Pseudocholinestérase. Des difficultés d'interprétation des données apportées par l'étude de la cholinestérase du sérum en pathologie.* « *Presse médicale* » 1946.41.471.

— 6. *Le rôle physiologique de la cholinestérase du sérum.* Com. XVe. Congrès Association des Physiologistes, Toulouse, avril 1947.

[132] Vincent (D.) et Beaujard (P.). —1. *Recherches sur les inhibiteurs de la cholinestérase.* « *Bull. Soc. Chim. Biol.* » Travaux des membres, 1943. 25. 1358.

— 2. *La détection des alcaloïdes inhibiteurs de la cholinestérase.* « *Ann. Pharmaceutiques françaises* », 1945.

[133] Vincent (D.) et Brygoo (P.). — 1. *La cholinestérase du sérum dans la syphilis.* « *Soc. Méd. et Chir. et Pharm.* » Toulouse, 20 février 1945.

— 2. *Etude de l'action de quelques antihistaminiques de synthèse sur la cholinestérase du sérum.* « *Soc. Pharm.* » Toulouse, 24 juin 1945.

[134] Vincent (D.) et Jullien (A.). — 1. *Contribution à l'étude de la cholinestérase chez les invertébrés. La cholinestérase de l'hémolymphe des mollusques.* « *C.R. Soc. Biol.* », 1938.127.628.

— 2. *Richesse de la glande à pourpre des Murex en esters de la choline.* « *C.R. Soc. Biol.* », 1938.127.1506.

— 3. *Les esters de la choline dans quelques organes des mollusques.* « *C.R. Acad. Sciences* », 1938.206.1145.

— 4. *Sur la teneur des divers organes des Murex en esters de la choline.* « *Soc. Biol.* » Lyon, 20 juin 1938.

— 5. *Sur les esters de la choline et la cholinestérase chez les crustacés.* « *Soc. Biol.* » Lyon, 24 octobre 1938.

— 6. *Recherches sur les esters de la choline chez les mollusques. Esters de la choline du myocarde. Activité cholinestérasique du myocarde et de l'hémolymphe.* « *Journ. Physiol. et Path. gén.* » 1938.

[135] VINCENT (D.) et LAURENT (R.). — *Un procédé de détection du Buis dans la bière.* « *Soc. Pharm.* » Toulouse, 7 juillet 1946.

[136] VINCENT (D.) et MALBEC (M.). — 1. *Action activatrice du gluconate de calcium en injection intraveineuse sur la cholinestérase du sérum chez l'Homme.* « *Soc. pharm.* » Toulouse, 7 juillet 1946.

— 2. *La cholinestérase du sérum dans la tuberculose pulmonaire. Soc. Méd. et Chir.* Toulouse, 21 janvier 1947.

— 3. *Intérêt du dosage de la cholinestérase du sérum dans la tuberculose pulmonaire.* « *Revue Le Poumon* » 1947 (sous presse).

[137] VINCENT (D.) et MATHOU (Mlle Th.). — *Action inhibitrice du Buis sur la cholinestérase du sérum.* « *C.R. Acad. Sciences* », 19 février 1945.

[138] VINCENT (D.) et MAUGEIN (Mlle A.). — *Dosage biochimique de l'ésérine par mesure de son action anticholinestérasique (application en matière médicale et en pharmacie).* « *Bull. Soc, Pharm.* », 1942.49.141.

[139] VINCENT (D.) et PRAT (Mlle J. de). — *Recherches préliminaires sur la cholinestérase du sérum dans les syndromes d'insuffisance hépatique.* « *C.R. Soc. Biol.* » 1942.136.821.

[140] VINCENT (D.) SEGONZAC (G.) et PRAT (Mlle J. de). — *La cholinestérase du sérum, son dosage. Intérêt clinique de son étude.* « *Ann. Biol. Chimique* » 1944.2.35.

[141] VINCENT (D.), SEGONZAC (G.), PRAT (Mlle J. de) et BRYGOO (P.). — *Sur la pathogénie de la tétanie.* « *Soc. Méd.* » Toulouse, 1944.2.4.

[142] VINCENT (D.) et SERO (Mlle I.). — *Recherches biochimiques et pharmacodynamiques sur* « *Tabernanthe Iboga* ». Baillon. « *Bull. Soc. Chim. Biol.* ». Travaux des membres, 1942.24.1352.

[143] VINCENT (D.) SERO (Mlle I.) et LAURENT (R.). — *Quelques données pharmacologiques sur le Buis* « *Buxus sempervirens* » *L.* « *Soc. Pharm.* » Toulouse, 16 mars 1947.

[144] WALZ (G.F.). — « *Neues Jahrbüch für Pharmacie* », 1859.12.302 ; 1860.14.15.

[145] WENSE. — « *Fermentforsrhung* », 1937.15.291.

[146] WILDENOW (C.-L.). — *Species plantarum*, 4e éd. Berlin, 1797, p. 337.

[147] WILLSTÄTTER, KUHN, LIND, und MEMMEN. — *Über Hemmung der Leberesterase durch Ketocarbonsüeresters.* « *Z. Physiol. Chem* ». 1927.167.303.

[148] WILSON et STONER. — « *Journ. of Physiol.* », 1943.102.

[149] YOKOTI (Y.). — « *Act. Soc. Opht.* Japan ». 1939.43.1617.

[150] ZELLER (E.) und BISSEGER (A.). — *Uber die Cholinesterase des Gehirns und der Erythrocyten.* « *Helvetia Chim. Acta* ». 1943.26.1619.

Imp. F. BOISSEAU, Rue du Taur. 34 - TOULOUSE
C. O. L. N° 31.2441 - N° d'impression 34 - 1947
Dépôt légal 3e trimestre 1947